

Univerzita Karlova v Praze

1. Lékařská fakulta

obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Disertační práce



Autor: MUDr. Michaela Neprašová

Markery ovlivňující průběh IgA nefropatie

Markers influencing the course of IgA nephropathy

Školitel: doc. MUDr. Dita Maixnerová PhD.

Konzultant: prof. MUDr. Vladimír Tesař DrSc., MBA, FASN, FERA

Praha 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

Z Praze, dne 24.11.2018

Michaela Neprašová

Podpis

Identifikační záznam:

NEPRAŠOVÁ, Michaela. *Markery ovlivňující průběh IgA nefropatie. [Markers influencing the course of IgA nephropathy]*. Praha, 2019. 113 s., 6 příl. Disertační práce. Universita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta. Klinika nefrologie. Školitel Maixnerová, Dita.

Poděkování:

Chtěla bych na tomto místě poděkovat své školitelce doc. MUDr. Ditě Maixnerové, PhD. za odborné vedení, konzultační činnost a podporu během celého postgraduálního studia, prof. MUDr. Janu Novakovi a prof. Ing. Miloslavu Suchánkovi, CSc. za pomoc a konzultace v oblasti laboratorního zpracování, zhodnocování výsledků a statistického zpracování. V neposlední řadě bych ráda poděkovala prof. MUDr. Vladimíru Tesařovi, DrSc., MBA, FASN za vytvoření příznivých podmínek k absolvování náročného postgraduálního studia.

1	Obsah	
1	Obsah	4
2	Seznam zkratk	7
3	Abstrakt	11
4	Abstract.....	13
5	Úvod	15
6	Patogeneze IgAN	16
7	Klinický, histologický obraz a léčba IgAN	18
8	Klinické, laboratorní a histologické ukazatele prognózy onemocnění IgAN	21
9	Biomarkery IgAN se vztahem k patogenezi a průběhu onemocnění	23
9.1	Sérové Gd-IgA1, anti-Gd-IgA1	23
9.2	Imunokomplexy obsahující vázanou protilátku anti-Gd-IgA1 typu IgA a/nebo IgG	25
9.3	Solubilní CD89-IgA komplexy	25
9.4	Komplement a jeho fragmenty	26
9.5	Močové biomarkery.....	28
9.6	Toll-like receptory	33
10	Cíle práce	35
11	Metodika práce	37
11.1	Známé klinické a laboratorní faktory ovlivňující prognózu českých pacientů s IgAN	37
11.2	Zhodnocení vztahu Gd-IgA1 a anti-Gd-IgA1 k aktivitě onemocnění, vývoji renální funkce a prognózy u českých pacientů s IgAN	38

11.3	Výzkum močových markerů a stanovení potenciálních specifických biomarkerů pro pacienty s IgAN	40
11.4	Stanovení nových potenciálních markerů IgAN pomocí proteomické a metabolické analýzy	41
11.5	Zhodnocení intrarenálního barvení TLR u pacientů s IgAN	43
12	Výsledky	45
12.1	Známé klinické a laboratorní faktory ovlivňující prognózu českých pacientů s IgAN 45	
12.2	Zhodnocení vztahu Gd-IgA1 a anti-Gd-IgA1 k aktivitě onemocnění, vývoji renální funkce a prognózy u českých pacientů s IgAN	51
12.3	Výzkum močových markerů a stanovení potenciálních specifických biomarkerů pro pacienty s IgAN	65
12.4	Stanovení nových potenciálních markerů IgAN pomocí proteomické a metabolické analýzy	74
12.5	Zhodnocení intrarenálního barvení TLR u pacientů s IgAN	80
13	Diskuze a závěr:	97
13.1	Známé klinické a laboratorní faktory ovlivňující prognózu českých pacientů s IgAN 97	
13.2	Zhodnocení vztahu Gd-IgA1 a anti-Gd-IgA1 k aktivitě onemocnění, vývoji renální funkce a prognózy u českých pacientů s IgAN	100
13.3	Výzkum některých močových markerů a stanovení potenciálních specifických biomarkerů pro pacienty s IgAN	102

13.4	Stanovení nových potenciálních markerů IgAN s využitím proteomické a metabolické analýzy	104
13.5	Zhodnocení intrarenálního barvení TLR u pacientů s IgAN	107
14	Přehled publikací.....	109
15	Souhrn	110
16	Summary	112
17	Literatura.....	114
18	Přiložené publikace	128

2 Seznam zkratek

AAV – ANCA asociovaná vaskulitida

ACE inhibitory – inhibitory enzymu angiotenzin-konvertázy

ANOVA – Analysis of Variance – analýza rozptylu

anti-Gd-IgA1 – protilátky proti galaktóza deficientní IgA1

APRIL – ligand indukující proliferaci

AUC – plocha pod křivkou

BAFF – aktivační faktor B buněk

CE-MS – kapilární elektroforéza rozšířená o hmotnostní spektrometrii

CKD – chronic kidney disease – chronické onemocnění ledvin

CNV – počet variant kopií

CrCl – kreatininová clearance

Dg – diagnóza

DN – diabetická nefropatie

EGF – epidermální růstový faktor

ERYU – erythrocyturie

eGFR – odhadovaná glomerulární filtrace

eGFR_f – odhadovaná glomerulární filtrace na konci sledování

ELISA – enzyme-linked immuno sorbent assay

ESRD – konečné stadium onemocnění ledvin

GaINAc – N acetyl-galaktosamin

Gd-IgA1 – galaktóza deficientní IgA1

GN – glomerulonefritida

HC – health control, kontrolní vzorek získaný od zdravého jedince

HSP – Henoch-Schönleinova purpura

HT – hypertenze

IgAN – IgA nefropatie

IgAVN – IgA vaskulitida s nefritidou

IgG – imunoglobulin G

IgG – anti – Gd-IgA1 – IgG autoprotiátky proti Gd-IgA1

IgM – imunoglobulin M

IL-6 – interleukin 6

IEF – izoelektrická fokusace

IEF / LC-MS / MS – izoelektrická fokusace kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní detekcí

IPG – komerční proužky gelu s imobilizovanými pH gradienty

iTRAQ – Isobaric tags for relative and absolute quantitation

KIM-1 – kidney injury molecule -1

LDA – lineární diskriminační analýza

LN – lupusová nefritida

MALDI-TOF / TOF MS – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry

MCD – minimal changes disease

MCP-1 – monocyty chemotaktický protein -1

MDRD – Modification of Diet in Chronic Renal Disease

MEST – Oxfordská klasifikace

M/F – mužské/ženské pohlaví

MN – membranózní nefropatie

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

Nano-LC/MALDI-MS/MS – nano-liquidní chromatografie s hmotnostní spektrometrií

NGAL – neutrofilní s gelatinázou asociovaný lipokalin

Nf- κ B – nukleární faktor kappa B

PANTHER – Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships

PPAR-Y – antagonist receptoru Y

PU – proteinurie

PU_f – proteinurie na konci sledování

ROC křivka – Receiver Operating Characteristic křivka

SD – standardní odchylka

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodné

S-kreat – sérový kreatinin

S-kreat_f – sérový kreatinin na konci sledování

sTfR – močový solubilní transferin

S-urea – sérová urea

TGF β – transforming growth factor β

TNF alfa – faktor nádorové nekrózy alfa, kachektin

TLR – toll-like receptory

U-kreat – močový kreatinin

VALIGA – European Validation Study of the Oxford Classification of IgA Nephropathy

VFN – Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

WHO – Světová zdravotnická organizace

3 Abstrakt

IgA nefropatie (IgAN) je celosvětově nejčastější primární glomerulonefritida s velmi závažnou prognózou, způsobuje selhání ledvin až u 50 % nemocných v průběhu 30 let. Pro stanovení diagnózy IgAN je nezbytné provedení renální biopsie, která je jako invazivní vyšetření spojena s řadou rizik pro pacienta (nejčastější je krvácení a jiné). Cílem naší práce bylo stanovit markery, které usnadní diagnózu a mohou pomoci při stanovení aktivity choroby, s odhadem prognózy a následným optimálním nasazením účinné terapie.

V pilotním projektu jsme u 19 pacientů s různými typy glomerulonefritid (IgAN, diabetická nefropatie, membranózní glomerulonefritida, lupusová nefritida, ANCA asociovaná vaskulitida) a 19 zdravých kontrol prokázali panel 7 biomarkerů (8-hydroxyguanosin, dodekanal, leukotrien C4, alfa1-antitrypsin, heparan sulfát, IgA-uromodulin, Gd-IgA1), které byly schopny zcela odlišit pacienty s IgAN od nemocných s jiným typem glomerulonefritid či zdravých kontrol.

V souboru 93 českých pacientů s IgAN jsme potvrdili vliv klinických faktorů (PU, HT, eGFR) na progresi funkce ledvin. Pomocí LDA a logistického regresního modelu jsme zjistili korelaci Gd-IgA1 naměřeného v séru nativně bez předlěčení neuraminidázou s renální funkcí a u pacientů se stabilní renální funkcí jsme potvrdili nízké sérové hladiny protilátek specifických proti Gd-IgA1 (anti-Gd-IgA1). Tyto výsledky doposud v literatuře nebyly popsány.

Pomocí logistické regrese a jednoho klinického faktoru (eGFR) a jednoho sérového markeru (anti-Gd-IgA1) jsme vytvořili model odhadu prognózy pacientů s IgAN již v době diagnózy.

Intrarenální barvení TLRs usnadnilo diagnózu IgAN, zcela odlišilo pacienty s IgAN od zdravých kontrol i s ANCA vaskulitidou a umožnilo stratifikovat pacienty s IgAN dle úrovně renální funkce a proteinurie.

V naší studii jsme potvrdili markery, které mohou pomoci při diagnóze onemocnění, ale zejména při stanovení aktivity choroby s odhadem prognózy i následným optimálním zahájením účinné terapie s možností oddálení progrese renální funkce k renálnímu selhání a snížením socio-ekonomických nákladů spojených s metodami náhradní funkce ledvin, v neposlední řadě i zlepšením kvality života pacientů.

4 Abstract

IgA nephropathy (IgAN) is the most common primary glomerulonephritis worldwide with a very severe prognosis, causing kidney failure in up to 50 % of patients in a period of 30 years. For the diagnosis of IgAN it is necessary to perform a renal biopsy, this is an invasive examination that carries number of risks for the patients (the most common is bleeding and others). The aim of our work was to identify markers that could facilitate diagnosis and might help in determining the disease activity with an estimate of prognosis and consequently optimal use of effective therapy.

In the pilot project on 19 patients with different types of glomerulonephritides (IgAN, diabetic nephropathy, membranous glomerulonephritis, lupus nephritis, ANCA associated vasculitis) and 19 healthy subjects we demonstrated a panel of 7 biomarkers (8-hydroxyguanosine, dodecanal, leukotriene C4, alpha1-antitrypsin, heparan sulfate, IgA-uromodulin, Gd-IgA1) that were able to completely differentiate patients with IgAN from other types of glomerulonephritides or healthy controls.

In a group of 93 Czech patients with IgAN we confirmed the influence of clinical factors (PU, HT, eGFR) on the progression of renal function. Using LDA and logistic regression modelling we found that serum Gd-IgA1 (native without pre-treatment with neuraminidase) correlated with renal function. We confirmed low serum levels of anti-Gd-IgA1 antibodies in patients with stable renal function. These results have not yet been published.

We developed an estimation model for prognosis of patients with IgAN at the time of diagnosis using logistic regression model, one clinical factor (eGFR) and one serum marker (anti-Gd-IgA1).

Intrarenal staining of TLR facilitated diagnosis of IgAN and it was able to distinguish IgAN patients from healthy controls even with ANCA vasculitis and allowed stratification of patients with IgAN based on renal function and proteinuria.

In our study we have confirmed markers that could help diagnose the disease but especially determine the disease activity with a forecast estimate. These markers also might help deciding on optimal start of an effective therapy with the possibility of delaying the progression of renal function to renal failure and reducing the socio-economic costs associated with replacement of kidney function, and last, but not least by improving the quality of life of patients.

5 Úvod

IgAN patří celosvětově mezi nejčastější primární glomerulonefritidy s odlišnou geografickou variabilitou. IgAN byla detekována ve 40 % biopsií nativních ledvin v Asii, ale v méně než 5 % biopsií ve střední Africe (1). Při zhodnocení 10 472 renálních biopsií provedených na našem území v letech 1994-2011 činila incidence IgAN v České republice 11,6 % (2). Jedná se o onemocnění s velmi závažnou prognózou, v průběhu 30 let dospěje až 30-50 % nemocných do chronického selhání ledvin. IgAN představuje závažný medicínský, sociální i ekonomický problém a celosvětově je tomuto onemocnění věnována velká pozornost.

Diagnostika IgAN a stejně tak i posouzení aktivity choroby, od jejíž výsledku se odvíjí indikace léčebného postupu, se v současné době opírá výhradně o výsledek renální biopsie, která jako invazivní vyšetření přináší mnohá rizika, včetně závažného až život ohrožujícího krvácení.

V posledních letech jsou intenzivně zkoumány nové potenciální biomarkery IgAN, které by umožnily neinvazivní posouzení aktivity onemocnění, jeho prognózu a riziko dalšího vývoje renální funkce či odpověď na léčbu.

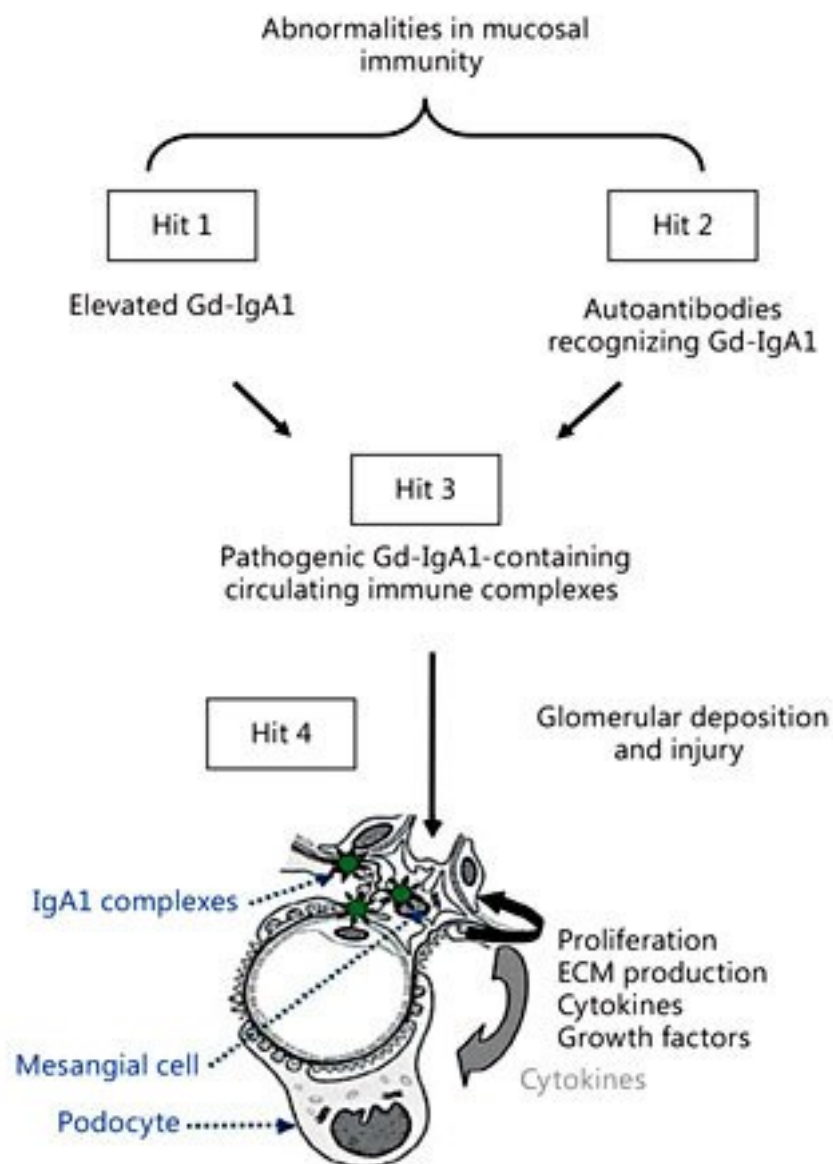
V naší studii se zabýváme stanovením klinických parametrů (renální funkce, proteinurie, erytrocyturie), sérových (Gd-IgA1, anti-Gd-IgA1) a močových markerů (dodekanal, 8-hydroxyguanosine, leukotrien C4, α 1-antitrypsin, IgA-uromodulinový komplex, galaktóza-deficitní IgA1 a heparan sulfát) k posouzení aktivity nebo progrese onemocnění včetně zhodnocení účinnosti léčby.

Potvrzení důležitých diagnostických markerů aktivity IgAN může přispět ke snížení rizika rozvoje chronického selhání ledvin se snížením ekonomických nákladů spojených s použitím metod náhradní funkce ledvin i k rozvoji specifických léčebných postupů.

6 Patogeneze IgAN

IgAN je autoimunitní onemocnění založené na “multi-hit“ patofyziologickém podkladě (1, 3), na jehož vzniku se nepochybně podílí genetické faktory i vlivy zevního prostředí (4, 5). Zásadní úlohu v patogenezi onemocnění představují Gd-IgA1 a anti-Gd-IgA1 (6). Molekuly Gd-IgA1 nesou koncový N-acetyl-galaktosamin, nebo jeho sialylovanou formu, která je rozpoznávána anti-glykanovými autoprotilátkami typu IgA1 a/nebo IgG s následnou tvorbou cirkulujících imunokomplexů (7). Tyto imunokomplexy nejsou účinně eliminovány normálním jaterním katabolismem a ukládají se v mezangiu glomerulů, což vede k prvnímu kroku glomerulárního poškození (Obr. 1) (8). Imunokomplexy způsobují stimulaci komplementového systému (12, 13), různých cytokinů (například TNF alfa a transformující růstový faktor beta) (14), aktivaci a proliferaci mezangiálních buněk (8), tvorbu extracelulární matrix s následným poškozením glomerulů i tubulointersticia. Klinicky se tento proces projevuje proteinurií, hematurií a progredující renální insuficiencí.

Důkladné porozumění molekulární podstaty patogeneze onemocnění IgAN může napomoci ke zjištění sérových a močových markerů, který by byly vodítkem k neinvazivní diagnostice, sledování průběhu choroby i efektivity léčby.



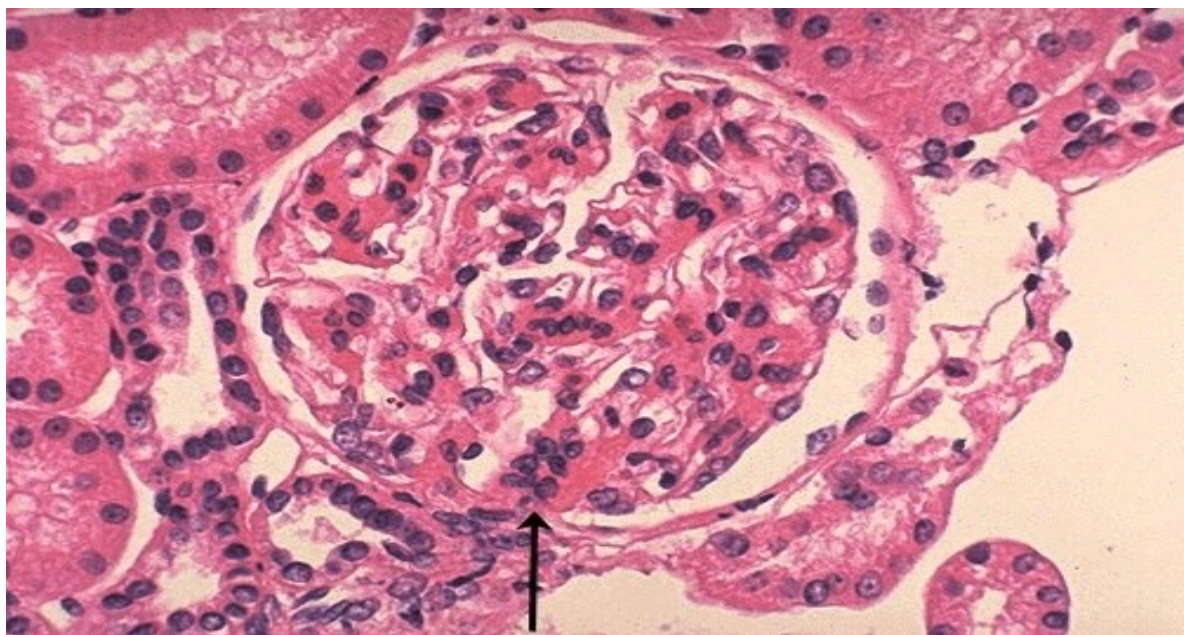
Obr. 1: Hypotéza patogeneze IgA nefropatie, převzato z: Novak, Rizk D, Takahashi K et al., New Insights into the Pathogenesis of IgA Nephropathy. Kidney Dis. (Basel). 2015; 1(1):8-18.

7 Klinický, histologický obraz a léčba IgAN

Nejčastějším a mnohdy i prvním klinickým projevem IgAN je mikroskopická hematurie izolovaná či s proteinurií, může však být pozorována i makroskopická hematurie, která je obvykle spojena s infekcí horních dýchacích cest. Epizody makroskopické hematurie bývají střídány mikroskopickou hematurií, která je u části pacientů dominantním klinickým projevem a často je zjištěna jen náhodně. Mikroskopická hematurie může být provázena obvykle malou proteinurií (< 2 g/24 hod), která bývá stabilní, může se však zvyšovat při teplotách či při atakách makroskopické hematurie a také při progresi nemoci (15). Proteinurie bez hematurie se u IgAN vyskytuje jen výjimečně (15). Vznik nefrotického syndromu u IgAN je vzácný, stejně jako akutní renální selhání na podkladě nekrotizující formy glomerulonefritidy se srpkami. Častá je přítomnost arteriální hypertenze. Laboratorní známky chronické renální insuficience mohou být zjištěny již v době diagnózy, nebo se rozvíjí během choroby, přičemž závažnost histologických změn v biopsii je ukazatelem dalšího vývoje funkce ledvin s odhadem prognózy onemocnění. Průběh onemocnění je provázen výraznou variabilitou, část pacientů vykazuje pouze intermitentní močový nález. Významná část nemocných (30-50 %) však dospěje v horizontu 30 let k selhání ledvin (16).

V histologickém nálezu renální biopsie u IgAN dominují depozita IgA v mezangiu glomerulů, současně ve stejné lokalizaci se až u 90 % nemocných nacházejí depozita komplementu (C3), mnohdy je zřejmý souběžný nález uložených IgG a IgM protilátek. Lokalizace depozit IgA a IgG koreluje s mezangiální a endokapilární celularitou (17). Ve studii s malou kohortou pacientů byla mezangiální depozice IgG u pacientů s IgAN spojena s přítomností přetrvávajících močových nálezů a závažnějšími klinickými rysy (18). U malé části biopsovaných pacientů jsou zachycena pouze izolovaná depozita IgA. Ve světelné mikroskopii

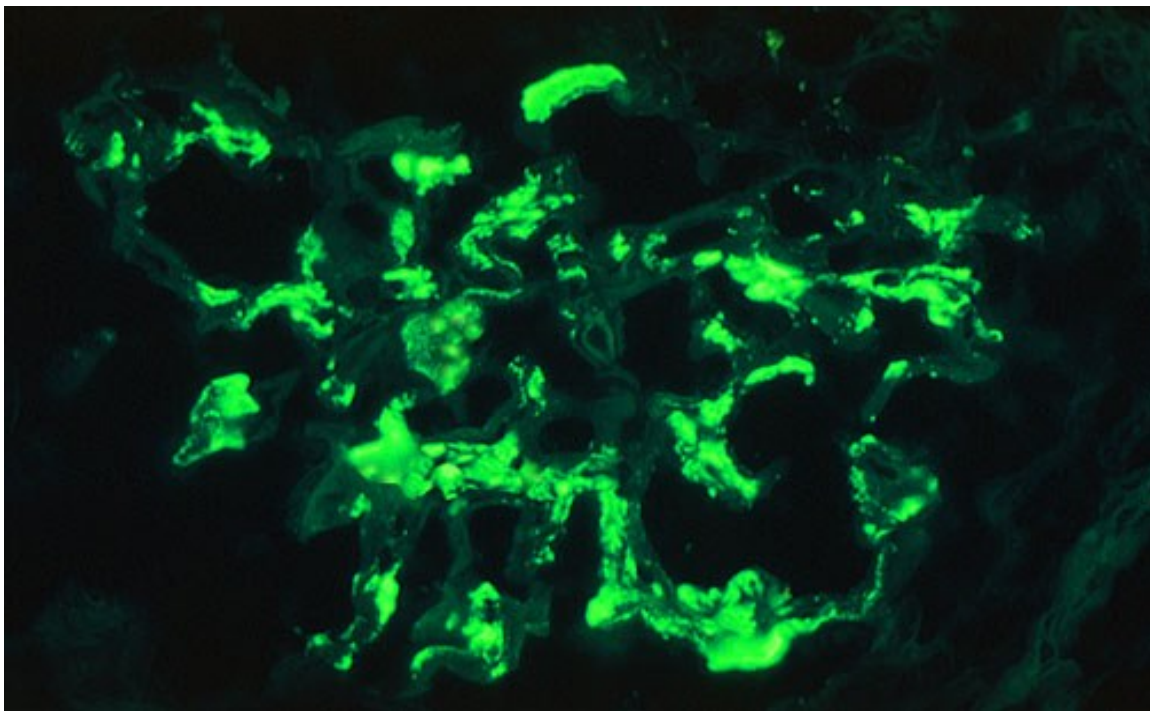
je typická mezangiální proliferace a expanze extracelulární matrix. Stupeň intersticiální fibrózy a glomerulární sklerózy je ukazatelem pro odhad prognózy onemocnění.



Obr. 2: IgAN, histologický nález, elektronová mikroskopie, zvýšení mesangiální celularity

Převzato z: Nikhil Sande, Kidney non-tumor primary glomerular diseases IgA nephropathy.

PathologyOutlines.com. 2014.



Obr. 3: IgAN, histologický nález, imunofluorescence, depozita anti Gd-IgA protilátek v mezangiu, Převzato z: Nikhil Sande, Kidney non-tumor primary glomerular diseases IgA nephropathy. PathologyOutlines.com. 2014.

Léčba IgAN stejně jako u jiných glomerulonefritid se zaměřuje na optimální korekci krevního tlaku ($\leq 130/85\text{mmHg}$ u pacientů s proteinurií $<1\text{ g}/24\text{ hod}$ a $\leq 125/75\text{mmHg}$ u pacientů s proteinurií $>1\text{ g}/24\text{ hod}$), lékem volby jsou z důvodu renoprotektivity ACE inhibitory nebo sartany.

Specifická imunosupresivní léčba je s ohledem na množství nežádoucích účinků indikována jen u nemocných s velkou proteinurií a aktivním nálezem v renální biopsii.

8 Klinické, laboratorní a histologické ukazatele prognózy onemocnění IgAN

Průběh IgAN je velmi variabilní. Jsou známy klinické a laboratorní ukazatele, které již v době diagnózy ale i v průběhu choroby mohou ovlivnit vývoj onemocnění – proteinurie, hypertenze, snížená hodnota odhadované glomerulární filtrace (eGFR) a histologický nálezn v biopsii ledvin (19). Za prognosticky závažné faktory posuzované v době biopsie jsou považovány hypertenze ($> 140/90$ mmHg), proteinurie >1 g/24 hod a nepříznivý histologický nálezn. Přítomnost těchto faktorů je spojována s vyšší pravděpodobností selhání ledvin s nutností dialyzační léčby či s úmrtím (2). Studie prokázala, že pravděpodobnost dvacetiletého renálního přežívání bez nutnosti dialyzační léčby u pacientů s přítomností všech 3 rizikových faktorů v době renální biopsie byla 36 %, oproti 96 % ve skupině pacientů bez přítomnosti těchto rizikových faktorů (2). Nejsilnějším prediktorem je hodnota proteinurie nejen v době diagnózy, ale i v průběhu onemocnění (9). Cílená léčba s dosažením proteinurie <1 g/24 hod snižuje riziko ztráty funkce ledvin (20). Některé studie ukazují, že hodnocení proteinurie v průběhu onemocnění je silnějším prognostickým faktorem, než proteinurie v době diagnózy (21).

Ke stanovení prognózy na základě histologických změn v biopsickém nálezu ledviny používáme v současné době Oxfordskou klasifikaci z roku 2009 (MEST klasifikace) (22). Tato klasifikace identifikuje 4 typy lézí se vztahem k rozvoji konečného selhání ledvin nebo 50% poklesu eGFR – mezangiální hypercelularita (M0 nebo M1), endokapilární proliferace (E0 nebo E1), segmentální skleróza (S0 nebo S1) a tubulární atrofie/intersticiální fibróza (T0 nebo T1 nebo T2) (22). Pomocí kombinace výše uvedených histologických ukazatelů z MEST skóre je možné určit riziko progresu onemocnění u pacientů s IgAN (23). Maximální skóre této klasifikace je 5, hodnoty skóre 2 a vyšší jsou považovány za nezávislý rizikový faktor vzniku konečného selhání ledvin. Ověření Oxfordské (MEST) klasifikace na velké kohortě evropských pacientů s IgAN umožnila studie VALIGA (24). Analýza celého spektra renálních patologií a

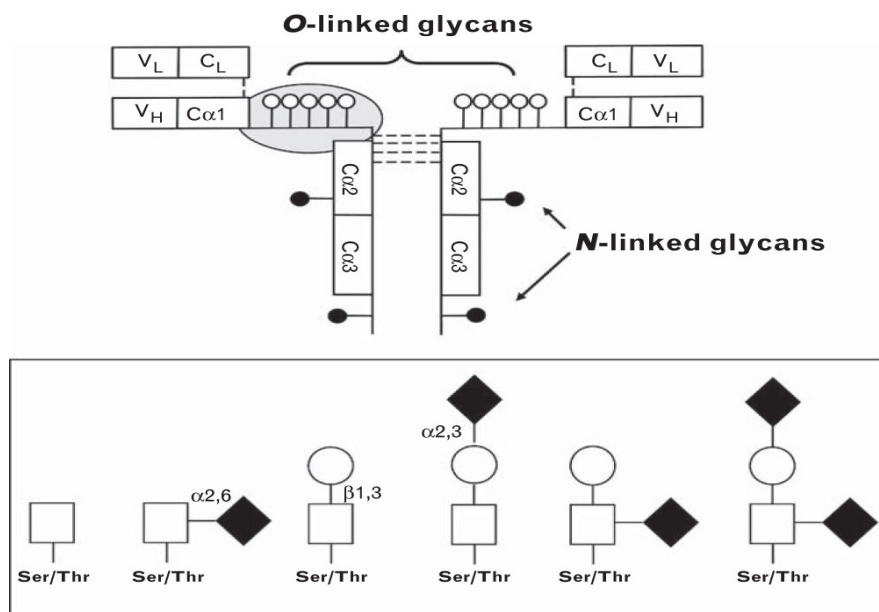
klinických stavů reprezentovaných v této kohortě potvrdila, že histologický nález s MEST skóre musí být zohledněn spolu s klinickými ukazateli zahrnujícími proteinurii, eGFR a léčbu před renální biopsií (24).

9 Biomarkery IgAN se vztahem k patogenezi a průběhu onemocnění

Doposud identifikované sérové a močové markery, u kterých byla prokázána souvislost s patogenezi IgAN, jsou Gd-IgA1, anti-Gd-IgA1 autoprotilátky typu IgA nebo IgG (25, 26), solubilní CD89-IgA komplexy (27), a močový solubilní transferinový receptor (sTfR) (28, 29). Mezi močové markery IgAN patří interleukin 6/epidermální růstový faktor (IL-6/EGF), poměr monocytárního chemotaktického proteinu/epidermálního růstového faktoru (MCP-1/EGF) a kidney injury molecule-1 (KIM-1) (30, 31). Významným močovým markerem je uromodulin, jehož zvýšená hladina předpovídá IgAN (32). Jsou známy i další močové markery IgAN, které korelují s klinickým průběhem tohoto onemocnění (například s vývojem renální funkce, proteinurií, histologickým nálezem), jako např. C4a desArg peptid, laminin G like 3peptid, free kappa light chains, alfa1 a beta1 mikroglobulin.

9.1 Sérové Gd-IgA1, anti-Gd-IgA1

Lidský cirkulující IgA může být tvořen podtřídou IgA1 nebo IgA2, nejčastěji je zastoupen třídou IgA1 v monomerní formě. Molekula IgA1 obsahuje O-glykan, který je složen GalNAc (N-acetylgalaktosamin) s navázanou galaktózou se zbytky kyseliny sialylové (Obr. 4).



Obr. 4: Převzato z: Wyatt RJ, Julian BA N., IgA nephropathy. Engl. J. Med. 2013; 368:2402-2414.

Složení O-vázaných glykanů v IgA1 se může lišit, nejčastěji nacházíme disacharid GaINAc-galakatosa a jeho mono a di sialylované formy (33) (viz Obr. 4). U nemocných s IgAN jsou prokazatelně vyšší hladiny cirkulujících IgA1 s O-glykany bez galaktózy obsahující koncové GaINAc nebo sialylované GaINAc (6). Zvýšená hladina sérového Gd-IgA1 je považována za prvotní faktor v patogenezi IgAN (viz Obr. 1) (1). U pacientů kavkazské rasy byly prokázány zvýšené hladiny sérového Gd-IgA1 ve srovnání se zdravými kontrolami (34). Další práce poukázaly na obdobné výsledky u pacientů asijského a afroamerického původu (35). Současně byla potvrzena i korelace mezi hladinou Gd-IgA1 a progresí IgAN, ale pouze u asijské populace (26).

Další důležitý krok v patogenezi IgAN představuje zvýšená tvorba protilátek specifických proti Gd-IgA1 s následným vznikem imunokomplexů (Obr. 1). Patogenní imunokomplexy s velkou molekulovou hmotností tvořené anti-glykanovými protilátkami IgG nebo IgA, které se vážou na Gd-IgA1, hrají zásadní roli v patogenezi IgAN (7). Zvýšené sérové hladiny imunokomplexů

složených z IgG protilátek a Gd-IgA1 korelovaly s klinickými parametry (proteinurií, konkrétně poměrem protein/kreatinin v moči) (36). Rovněž dle zvýšené hladiny IgG protilátek lze u pacientů s IgAN odhadnout riziko selhání ledvin (37). Vysoké hladiny IgG autoprotilátek specifických proti Gd-IgA1 představují marker progresu onemocnění IgAN (36, 37).

Hladiny Gd-IgA1 a odpovídající autoprotilátky jsou navrženy jako markery sledování progresu onemocnění a hodnocení terapeutické odpovědi (37, 38). Jsou známy práce, které dokumentují stabilitu hladin Gd-IgA1 nemocných s IgAN (37, 38, 39, 40), stejně tak vzorky u dětí s IgAN vykazují stabilitu hladin Gd-IgA1 ve srovnání se zdravými kontrolami po dobu 12 měsíců (40). Diagnostický přínos markeru Gd-IgA1 však může být komplikován skutečností, že zvýšené hodnoty mohou být pozorovány také u některých jedinců bez klinických projevů IgAN, a výše hladiny může být modifikována věkem a etnickou příslušností (38). V budoucnu bude muset být při dalším výzkumu využití tohoto markeru pečlivě zváženo věk, rasa a pravděpodobně i pohlaví pacienta. Význam stanovení Gd-IgA1 pro IgAN je stále předmětem výzkumu.

9.2 Imunokomplexy obsahující vázanou protilátku anti-Gd-IgA1 typu IgA a/nebo IgG

Tvorba a ukládání těchto imunokomplexů je třetím zásadním krokem v patogenezi IgAN. Dosavadní publikované práce (41, 42) měřily přítomnost zmíněných cirkulujících imunokomplexů a zabývaly se biologickou aktivitou imunokomplexů, ale nehodnotily jejich diagnostický a prognostický význam ve vztahu k IgAN.

9.3 Solubilní CD89-IgA komplexy

Úloha solubilních CD89-IgA komplexů v patogenezi IgAN není zcela jasná, pravděpodobně se podílí na aktivaci mononukleárních leukocytů a jejich přesunu do mezangia a intersticia ledviny. Některé publikované práce předpokládají patogenní vliv solubilních CD89-IgA

komplexů (43), jiné studie poukazují na možný protektivní efekt před progresivním poškozením ledvin u pacientů s IgAN (44).

9.4 Komplement a jeho fragmenty

Aktivace komplementu hraje důležitou roli v patofyziologii rozvoje onemocnění IgAN, probíhá lektinovou nebo alternativní cestou, ale poznatky o tomto procesu stále nejsou kompletní. C3 složka komplementu byla detekována u více než 90 % případů pacientů s primární IgAN (38). Hladina cirkulujících proteinů komplementu byla navržena jako marker IgAN se vztahem k prognóze onemocnění (12), vylučování složek komplementu bylo rovněž navrženo jako marker aktivity IgAN (12). Studií bylo prokázáno, že aktivace C3 složky komplementu, která byla definována jako snížení sérové hladiny C3 a zvýšení rozpadových fragmentů komplementu v séru se zvýšenou glomerulární depozicí komplementu je markerem aktivity IgAN (12).

Některé práce předpokládají souvislost mezi faktorem H a C3 faktorem komplementu, produkty genu pro faktor H komplementu a shluku genů, které souvisejí s faktorem H modulují alternativní cestu aktivace komplementu (38). Interpretace hladiny C3 komplementu není jednoznačná. Některé práce poukazují na asociaci C3 složky komplementu s faktorem H v malém vzorku zdravých pacientů kavkazské rasy a předpokládají, že hladina faktoru H podmiňuje hladinu C3 faktoru u pacientů, u kterých neprobíhá aktivace komplementu (45). Současně ale upozorňují, že k úspěšné interpretaci C3 složky komplementu musí být vzaty v úvahu ještě hodnoty B faktoru komplementu, inaktivátoru C3b, a beta 1 H (45). V malé kohortě pacientů s IgAN z USA byly zjištěny signifikantně zvýšené hodnoty C3, H, B a I faktoru u pacientů s normální renální funkcí ve srovnání s nemocnými s IgAN a známkami chronické renální insuficience (46). Tyto nálezy naznačují, že zvýšené hodnoty C3, H, B a I faktoru mohou být spojeny s normální renální funkcí, zatímco u renální insuficience není

neobvyklý pokles těchto faktorů komplementu (46). Nicméně tato studie byla provedena na malém vzorku pacientů. Souvislost těchto nálezů s patogenezí IgAN je předmětem dalšího zkoumání.

Sérové hladiny IgA imunoglobulinů jsou u nemocných s IgAN zvýšené, tento nález je však nespecifický a neumožňuje použití hladiny IgA jako diagnostického testu. Někteří autoři navrhují použití hladiny C3 komplementu ke zvýšení přesnosti IgA imunoglobulinu jako diagnostického testu u IgAN (38). V japonské studii bylo provedeno měření poměru IgA/C3 u 306 pacientů s IgAN či jinými glomerulonefritidami a u 418 zdravých kontrol. Při použití hodnoty poměru IgA/C3 2,14, která byla lehce nad střední hodnotou zdravých kontrol, dosáhl tento poměr citlivosti 79 % a specifity 61 %. Poměr IgA/C3 byl navržen jako diagnostický biomarker IgAN před renální biopsií (47). Užitečnost poměru IgA/C3 spolu s mikroskopickou hematurií, vysokými hodnotami sérového IgA a perzistující proteinurií při predikci diagnózy IgAN a jejího odlišení od jiných onemocnění ledvin potvrdila jiná studie při vyšetření 364 nemocných s IgAN a 289 pacientů s jiným onemocněním ledvin (48).

Zajímavé poznatky byly zjištěny i při analýze fragmentů komplementu vznikajících jeho aktivací. Při měření fragmentů komplementu iC3b-C3d u 81 nemocných s IgAN (49) byly zjištěny známky aktivace C3 s patrným zvýšením alespoň jednoho z fragmentů iC3b-C3d u 75% dospělých a 57 % pediatrických pacientů s IgAN (49).

Souvislost zvýšené hladiny některého z těchto neo-antigenů s hematurií, proteinurií nebo stupněm renální insuficience ale nebyla prokázána (49). Vysoká hladina C3 komplementu byla spojena se závažným histologickým nálezem v renální biopsii (50). I tato práce prokázala aktivaci komplementu u IgAN, jejíž přesný patofyziologický význam je zatím nejasný.

Výsledky dosud provedených prací naznačují, že komplementové faktory a jejich fragmenty v moči, séru i ledvinné tkáni by mohly sloužit jako biomarkery diagnostiky onemocnění IgAN

(3). Přiblížení se k tomuto cíli bude nepochybně zajímavé za předpokladu dokonalého pochopení úlohy komplementu v patogenezi IgAN.

9.5 Močové biomarkery

Močová peptidomika je nově vznikající a pravděpodobně i slibná oblast výzkumu biomarkerů IgAN. Recentní práce prokázaly, že složení močových peptidů u pacientů s IgAN se liší od zdravých kontrol nebo od pacientů s jiným typem chronické glomerulonefritidy (51,52). Většina močových endogenních peptidů má specifickou expresi, která je ovlivněna fyziologickými i patofyziologickými procesy probíhajícími v ledvinách a močových cestách, mohou se proto stát biomarkery IgAN (53).

IgAN je u mnohých pacientů provázena různě velkou nebo kolísající proteinurií. Je používána jako neinvazivní marker monitorace a předpovědi vývoje onemocnění. U těžkých forem IgAN jsou často do moči vylučovány imunoglobuliny a jejich fragmenty (51, 54), které v ledvinách pravděpodobně vznikají působením peptidáz (55). Tyto proteiny a/nebo fragmenty jsou předmětem dalšího výzkumu z hlediska potenciálních biomarkerů.

Při zkoumání močového proteomu se využívá kapilární elektroforéza rozšířená o hmotnostní spektrometrii (CE-MS) (51, 52, 54). Ve studii, která srovnávala vzorky moči 45 pacientů s IgAN se vzorky 13 pacientů s membranozní nefropatií a 57 zdravými kontrolami, byla použita k detekci močového proteomu metoda kapilární elektroforézy rozšířená o hmotnostní spektrometrii (52). Výsledky studie ukázaly přítomnost specifického polypeptidového vzorce v moči, který odlišil pacienty s IgAN od ostatních kontrol (52). Léčba pacientů s IgAN byla v této studii spojena se změnou specifického polypeptidového močového vzorce (52). V další studii, která se zabývala výzkumem močového proteomu srovnávala přesnost měření pomocí metody CE-MS a elektroforézy v polyakrylamidovém gelu s přítomností dodecysíranu sodného

(SDS-PAGE) /Western blot (51, 54). Obě srovnávané metody přinesly velmi podobné výsledky v nálezu abnormalit močových polypeptidů ve skupině pacientů s IgAN, Henoch-Schönleinovou purpurou a sekundárně navozenou IgAN u nemocných s jaterní cirhózou při infekci virem hepatitidy C (51, 54). Studie, která zkoumala složení močového proteomu u pacientů s IgAN, identifikovala 30 proteinů v moči, které byly významně zvýšeny nebo sníženy ve srovnání se zdravými kontrolami, jako potenciální biomarkery v moči byly určeny např. alfa-1- antitrypsin, apolipoprotein A1, antigen CD44 nebo kininogen (56). Tyto potenciální biomarkery by měly být ověřeny v dalších studiích.

Analýza močového proteomu má velký význam pro identifikaci a měření biomarkerů klinicky použitelných k určení diagnózy a možná i prognózy IgAN (38).

Biomarkery IgAN v moči	Klinická asociace	Reference
Soluble transferrin receptor (sTfR)	Zvýšení u pacientů s IgAN nebo HSP, koreluje s výší proteinurie	(57)
α 1-and β 2-microglobulin	Koreluje s proteinurií	(58)
Kidney injury molecule-1 (KIM-1)	Koreluje s proteinurií, v kombinaci s kreatininem koreluje se zhoršenou renální prognózou	(59)
Interleukin-6/epidermal growth factor (IL-6/EGF)	Marker progresu IgAN, koreluje s renální prognózou	(60)
Epidermal growth factor/monocyte chemotactic protein-1 (EGF/MCP-1)	Koreluje se závažností histologického nálezu a renální prognózou	(61)
Fractalkine	Koreluje s patogenezí imunokomplexy-zprostředkované GN	(62)
Laminin G-like 3 peptide (perlecan)	Snížené hladiny nepřímo korelují s histologickými rysy	(63)
Free kappa light chains	Snížené hladiny nepřímo korelují s histologickými rysy	(63)
Uromodulin	Zvýšená hladina předpovídá IgAN	(32)
α -1 antitrypsin	Zvýšená hladina v moči je spojována s nefrotickým syndromem	(64)

Biomarkery IgAN v moči	Klinická asociace	Reference
Podocalyxin	Spojován s histologickým nálezem ledvinného poškození	(65)
Mannose-binding lectin	Koreluje s funkcí ledvin a proteinurií	(66)
C4a desArg peptide	Spojován s těžkými histologickými změnami u IgAN	(67)

Tab. 1: Biomarkery v moči a jejich klinický význam, převzato z: Maixnerova D, Reily C, Bian Q et al., Markers for the progression of IgA nephropathy. J. Nephrol. 2016; 29(4):535-41.

Stanovení močového solubilního transferinového receptoru (sTfR) imunofelometrickým testem s latexem je citlivou metodou k určení potenciálního biomarkeru IgAN a HSP (57). Nález byl potvrzen ve studii se 132 pacienty s IgAN či HSP, u kterých byl zjištěn statisticky vyšší výskyt sTfR oproti zdravým kontrolám (57). Navíc byl zaznamenán i statisticky významný rozdíl u pacientů s aktivní chorobou proti nemocným, kteří již dosáhli remise (57). Močový biomarker KIM-1 a NGAL jsou markery tubulárního poškození ledvin různé etiologie vzniku. Močový KIM-1 byl zkoumán jako možný biomarker IgAN (59). Biomarker KIM-1 v moči koreloval s proteinurií a spolu s výchozím kreatininem v séru byl potvrzen nezávislým prediktorem ESRD (59). Byla prokázána pozitivní korelace KIM-1 s proteinurií, ale i se sérovým kreatininem a negativní korelace s eGFR (59). Potvrzena byla i korelace množství vylučovaného močového KIM-1 s rozsahem histologického poškození ledvin (68). U nemocných s IgAN a těžkým mezangiálním postižením, tvorbou srpků a endokapilární proliferací bylo vyšší vylučování KIM-1 v moči než u pacientů s méně závažným histologickým nálezem (68). Močový KIM-1 může být důležitým biomarkerem pro neinvazivní

hodnocení míry poškození ledvin u IgAN (68). Některé studie naznačují i pravděpodobnou možnost využití močového KIM-1 jako biomarkeru léčebné odpovědi IgAN (69).

Interleukin 6 (IL-6) je produkován mezangiálními a tubulárními buňkami lidských ledvin a byl navržen jako marker mezangiální proliferace a tubulárního poškození (70). Zvýšené hladiny IL-6 v moči korelovaly s progresivním průběhem onemocnění (71). Epidermální růstový faktor (EGF) je exprimován v Henleově kličce a distálním tubulu. Poměr IL-6/EGF v moči koreloval s tubulointersticiálním poškozením u IgAN a byl navržen jako prognostický marker poškození ledvin (60).

Tvorba cytokinů hraje významnou roli v progresi poškození ledvin u IgAN (61). Nerovnováha mezi ochrannými cytokiny jako je EGF a prozánětlivými cytokiny jako je MCP-1 (monocyt chemotactic peptid 1) se pravděpodobně podílí na závažnosti rozvoje intersticiální fibrózy. V kohortě 132 pacientů s IgAN bylo potvrzeno možné využití poměru EGF/MCP-1 jako prognostického markeru vývoje ESRD u pacientů s IgAN (61). Další prozánětlivý cytokin fractalkin spolu s močovým MCP-1 korelovaly se stupněm erytrocyturie a inverzně korelovaly i se stupněm eGFR (70).

Fragmenty uromodulinu vylučované močí lze využít jako biomarker neinvazivní diagnostiky IgAN (72). Hladina močového uromodulinu souvisí s rozsahem intersticiální fibrózy a tubulární atrofie a byla potvrzena jako rizikový faktor poklesu eGFR (73). Stanovení komplexu IgA-uromodulin v moči metodou ELISA může sloužit jako neinvazivní marker diagnózy IgAN (74).

Dalším biomarkerem specifickým pro IgAN byly navrženy fragmenty glomerulárních depozit Gd-IgA1 vylučované močí (75). Močové hladiny Gd-IgA1 korelovaly s výší proteinurie (75).

9.6 Toll-like receptory

Toll-like receptory (TLR) jsou receptory bílkovinné povahy, které se nacházejí na povrchu cytoplazmatických membrán, a jsou schopné rozeznávat organismu cizí, potenciálně nebezpečné molekuly (76). Jsou přítomné zejména na buňkách imunitního systému jako jsou například monocyty nebo makrofágy, ale byly prokázány i na sliznicích některých dalších orgánů, jako např. střevo, plíce nebo i ledviny (76). Při setkání s noxou zodpovídá aktivace TLR navázáním ligandu za rozvoj imunitní a zánětlivé odpovědi organismu (76). Jedná se o první obrannou linii při napadení hostitele patogenem. Patogeny, jejichž vazba na TLR vede k imunitní odpovědi, mohou být bakteriálního či virového původu. Může se jednat i o endogenní ligandy, včetně těch, které vznikají uvolněním z nekrotických tkání nebo zánětlivým poškozením (77, 78).

Lidské TLR jsou tvořeny deseti skupinami (TLR1-TLR10) (79). Každý typ TLR v lidském těle je senzitivní jen pro určitou molekulu nebo skupinou molekul (76). Prostřednictvím aktivace TLR2, TLR4 a TLR5 jsou rozeznávány složky bakteriálních patogenů, TLR3, TLR7 a TLR9 dokážou rozpoznat virové komponenty (80).

Předpokládá se, že slizniční imunita může hrát významnou roli při rozvoji IgAN (80, 81). Aktivace slizniční imunity může být navozena vlivem patogenů vnějšího prostředí nebo produktů, které se vážou na TLR, a jež jsou vyjádřeny na imuno-kompetenčních buňkách, ale i ve tkáni ledvin (81). Z dosud provedených prací je patrná up-regulace TLR na buňkách periferní krve, nicméně dosud máme málo informací o jejich chování v ledvinné tkáni (81). Při aktivaci TLR se spouští společná intracelulární signální dráha, která vede k aktivaci cytokinů a chemokinů, molekul buněčné adheze a ko-stimulačních molekul, které podněcují přirozenou i adaptivní imunitní reakci a zánět (82). Následuje aktivace neutrofilů, makrofágů a dalších

buněk přirozeného imunitního systému, které vedou k zánětlivým změnám glomerulu a poškození ledvin (78, 83).

V japonské studii byla porovnávána exprese mRNA TLR v buňkách periferní krve u skupiny pacientů s IgAN, IgAVN a nemocných se syndromem tenkých bazálních membrán (80). Práce prokázala signifikantně vyšší expresi mRNA TLR2, TLR3, TLR5 a TLR7 v leukocytech pacientů s IgAN a IgAVN ve srovnání s nemocnými se syndromem tenkých bazálních membrán (80). Hladina mRNA TLR4 byla výrazně vyšší ve skupině nemocných s IgAN ve srovnání s ostatními pacienty (80). Hladiny mRNA TLR5 a TLR9 byly zřetelně vyšší u pacientů s IgAVN (80). U pacientů s IgAN korelovaly hladiny mRNA TLR2, TLR3, TLR5 a TLR9 s proteinurií (80). Byla prokázána korelace hladiny mRNA TLR4 se sérovou hladinou IgA u nemocných s IgAN (80).

Zvýšená exprese mRNA TLR4 v monocytárních leukocytech u pacientů s IgAN proti zdravým kontrolám byla potvrzena i v jiné studii (84). Byla prokázána zvýšená exprese mRNA TLR4 ve skupině pacientů s IgAN s vysokou aktivitou onemocnění proti nemocným s IgAN v remisi. Úroveň exprese mRNA TLR4 korelovala i s proteinurií (84), ale exprese mRNA TLR3 a TLR7 v monocytárních leukocytech u pacientů s IgAN potvrzena nebyla (84).

10 Cíle práce

Cílem naší práce bylo stanovit neinvazivní diagnostické testy, které by mohly být použity pro detekci subklinických forem IgAN. U nemocných s již prokázanou IgAN renální biopsií bude možné testy použít ke zhodnocení aktivity, prognózy onemocnění i účinnosti léčby a vyhnout se tak opakovanému invazivnímu vyšetření biopsie ledvin spojené s možnými až život ohrožujícími komplikacemi (krvácení, šokový stav a jiné).

Naše pracovní hypotéza je založena na stanovení odlišných hladin abnormálně glykosylovaných forem IgA1 i protilátek specifických proti Gd-IgA1 v séru i na detekci specifických biomarkerů v moči u českých pacientů s IgAN s potenciálně horší prognózou. Použití kombinace klinických, histologických a sérových (Gd-IgA1 i anti-Gd-IgA1) i močových markerů bude možné využít pro přesnější posouzení pravděpodobné progresse onemocnění u pacientů s IgAN a pro optimální nasazení účinné terapie.

V naší studii si klademe za cíl:

1. Potvrdit známé klinické faktory a histologické nálezy ovlivňující prognózu pacientů s IgAN v rozsáhlé kohortě českých pacientů. Za doposud známé zásadní prognostické faktory, které ovlivňují progresi onemocnění IgAN, jsou považovány hypertenze v době diagnózy, proteinurie > 1 g/24 hod, proteinurie přetrvávající v průběhu onemocnění a nepříznivé histologické změny v renální biopsii (zejména tubulointersticiální fibróza).
2. A) Zhodnotit vztah sérových markerů (Gd-IgA1 a anti-Gd-IgA1) k aktivitě onemocnění, k vývoji renální funkce a prognóze českých pacientů s IgAN. Některé práce poukazují na zásadní korelaci mezi hladinou Gd-IgA1, anti-Gd-IgA1 a progresí onemocnění (37). V kohortě 275 čínských nemocných korelovala zvýšená hladina Gd-IgA1 se zvýšeným rizikem zhoršení renální funkce (26). Ve francouzské populaci

zvýšené hladiny anti-Gd-IgA1 byly spojeny s horší prognózou onemocnění (37).

B) Pomocí laboratorních parametrů funkce ledvin a jednoho ze sérových biomarkerů (Gd-IgA1 či anti-Gd-IgA1) stanovit již v době diagnózy onemocnění prognózu pacientů s IgAN.

3. Využití proteomiky a metabolomiky při vyšetření močí u pacientů s IgAN se stanovením nových potenciálních markerů IgAN. Výzkum některých močových markerů (dodekanal, 8- hydroxyguanosine, leukotrien C4, α 1-antitrypsin, IgA-uromodulinový komplex, galaktóza-deficitní IgA1 a heparan sulfát) a stanovení potenciálních specifických biomarkerů pro pacienty s IgAN.
4. Zhodnotit intrarenální expresi TLR u pacientů s IgAN, a posoudit jejich využití nejen pro diagnózu onemocnění, ale i pro rozlišení jednotlivých podskupin pacientů s IgAN podle úrovně renální funkce a proteinurie.

11 Metodika práce

11.1 Známé klinické a laboratorní faktory ovlivňující prognózu českých pacientů s IgAN

Provedli jsme retrospektivní analýzu 520 pacientů s histologicky ověřenou IgAN, kteří byli diagnostikováni a sledováni ve více nefrologických centrech v České republice (192 pacientů ze Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, 328 pacientů z ostatních center ČR) od ledna 2000 do prosince 2010. Hodnotili jsme klinická a demografická data a léčbu pacientů s IgAN. Nemocní, kteří trpěli jaterní cirhózou, Henoch-Schönleinovou purpurou nebo sekundární etiologií IgAN byly ze studie vyloučeny. Diagnóza IgAN byla stanovena na základě biopsie ledvin. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s biopsií ledvin a s účastí ve studii, studie byla schválena etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze (1443/11 S-IV).

Byla hodnocena klinická data a údaje o léčbě – sérový kreatinin ($\mu\text{mol/l}$), eGFR (ml/s/1,73m^2 , měřeno jako kreatininová clearance, byly použity 2 hodnoty – vstupní a konečná), proteinurie (g/24 hod), mikroskopická hematurie (pozitivní nebo negativní dle nálezu močového sedimentu), arteriální hypertenze (dle WHO kritérií), antihypertenzivní a imunosupresivní terapie.

Všechna data byla statisticky analyzována. Vliv různých proměnných na přežívání ledvin byl zhodnocen pomocí Kaplan-Meierových křivek přežití a srovnání bylo provedeno s použitím log rank testu. Proměnné ovlivňující přežívání ledvin byly hodnoceny pomocí Coxova regresního modelu proporcionálních rizik. Multivariantní analýza přežití ledvin s vybranými proměnnými byla vytvořena postupným algoritmem v Coxově proporcionálním modelu. K porovnání klinických parametrů mezi různými centry byly použity dva vzorky t-testu nebo chí kvadrátového testu. Porovnání s prognózou progresu renální funkce posuzované podle Bartosikova vzorce bylo hodnoceno analýzou závislosti v souladu s McNemarovým testem.

Všechny testy byly považovány za statisticky významné při hodnotě $P < 0,05$. Statistické analýzy byly provedeny pomocí BMDP Statistical Software, Release 8.1.

11.2 Zhodnocení vztahu Gd-IgA1 a anti-Gd-IgA1 k aktivitě onemocnění, vývoji renální funkce a prognózy u českých pacientů s IgAN

Provedli jsme odběry krve u 91 českých pacientů s histologicky ověřenou IgAN v době biopsie ledvin. Vzorky byly uchovány zmražením při minus 80 stupních Celsia.

Nález v době diagnózy	Hodnota (standardní odchylka)
S-kreat ($\mu\text{mol/l}$)	205 (182)
eGF (MDRD, ml/min/1,73m^2)	56 (39)
Proteinurie (g/24 h)	2,3 (2,2)
Sérové IgA ($\mu\text{g/ml}$)	5062 (2035)
Sérové Gd-IgA1 ($\text{U/l } \mu\text{g IgA}$) bez neuraminidázy	116 (63)
Sérové Gd-IgA ($\text{U/l } \mu\text{g IgA}$) s neuraminidázou	470 (275)
Sérové Gd-IgA (U/ml) bez neuraminidázy	568 810 (353 501)
Sérové Gd-IgA (U/ml) s neuraminidázou	2 337 184 (1 465 651)
Pohlaví M (%)	74
Věk (roky)	43,6 (14,5)
Průměrná doba sledování (roky)	$3,5 \pm 1,1$

Tab. 2: Přehled klinických a laboratorních údajů: charakteristika souboru 91 pacientů z ČR s histologicky ověřenou IgAN.

Na základě klinických a laboratorních dat jsme pacienty rozdělili na skupinu se stabilní funkcí ledvin (neprogrese), dále na skupinu s poklesem $eGFR \geq 50 \%$ proti výchozí hodnotě (progrese) a skupinu pacientů s ESRD, která byla definována výší kreatininu $\geq 400 \mu\text{mol/l}$ v době diagnózy a poklesem $eGFR \leq 15 \text{ ml/min/1,73m}^2$ na konci sledování nebo pacienti, kteří zahájili dialyzační léčbu. Studie byla schválena etickou komisí VFN v Praze. Všichni účastníci studie podepsali informovaný souhlas.

Stanovení koncentrace celkové IgA bylo měřeno pomocí ELISA a hladiny Gd-IgA1 byly stanoveny pomocí lektinové ELISA s použitím lektinu z *Helix aspersa*. Měření lektinu proběhlo na nativních vzorcích a vzorcích ošetřených neuraminidázou. Původní metoda využívá neuraminidázou ošetřené IgA1 k odstranění sialové kyseliny vázané na O-glykany za účelem stanovení IgA1 se zbytky GaINAc včetně těch, které byly sialylovány. V našem výzkumu jsme použili vazbu lektinu na neuraminidázou ošetřené IgA1 stejně tak jako na nativní IgA1. Hladina sérové autoprotilátky specifické pro Gd-IgA1 byla měřena metodou ELISA s použitím Gd-IgA1 jako antigenu.

Statistické zhodnocení proběhlo za použití diskriminační analýzy a logistické regrese. Diskriminační analýza předpovídá účast ve skupině nebo kategorii, která se zakládá se na sledování hodnot mnoha spojitých proměnných (85). Údaje pro diskriminační analýzu tvoří vzorek pozorovaných objektů se známou příslušností v určité skupině spolu s jejich hodnotami na spojitých proměnných. Použili jsme diskriminační analýzu s transformovanými proměnnými. Pro ověření správné diskriminační schopnosti byla použita matice záměn, která umožnila klasifikaci jednotlivých objektů v těchto kategoriích.

Byl použit logistický model, jehož principem je spojit výskyt nebo neexistenci události s vysvětlujícími proměnnými. Logistická regrese je často využívaná metoda, která se zabývá problematikou odhadu pravděpodobnosti nějakého jevu (závislé proměnné) na základě určitých známých skutečností (nezávislých proměnných), které mohou ovlivnit výskyt jevu. Použili

jsme logistickou regresi pro validaci výsledků diskriminační analýzy a pro výpočet ROC křivek u dvou skupin. Všechny výpočty byly provedeny za pomoci programu XLSTAT.

11.3 Výzkum močových markerů a stanovení potenciálních specifických biomarkerů pro pacienty s IgAN

Vzorky moči byly odebrány v den biopsie ledvin 19 zdravým pacientům a 19 pacientům s histologicky prokázanou IgAN nebo jiným onemocněním ledvin. Vzorky byly před zpracováním uchovány při minus 80 stupních Celsia. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s účastí ve studii a studie byla schválena Etickou komisí VFN v Praze.

Dg	Poč.	S-urea mmol/l	S- kreat μmol/l	PU g/24hod	PU g/l	Věk roky	Pohlaví M/F	eGFR ml/s/1,73m ² MDRD	U- kreat mmol/l
IgAN	11	9,8±4,7	158±70	1,54±1,28	0,85±0,61	49±18	10/1	50±30	7,9±5,0
MN	2	10,4±0,5	15±64	5,92±1,75	2,97±1,44	56±18	1/1	35±6	5,7±1,3
LN	2	16,1±0,5	283±15	3,88±3,18	2,82±1,43	33±4	1/1	20±6	7,1±1,7
DN	2	29,6±9,1	293±19	2,24±0,59	1,31±0,23	62±14	0/2	14±1	3,6±1,1
ANCA	2	17,2±10,7	460±68	2,86±2,55	0,93±0,25	42±14	1/1	12±5	6,2±0,8

Tab. 3: Klinické a laboratorní údaje o pacientech s onemocněním ledvin ve studii

Vzorky moči byly analyzovány pomocí necílené metabolické analýzy a cílených proteomických analýz za použití více experimentálních technik včetně kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, imunomagnetické izolace cílových proteinů spolu

s kvantifikací hmotnostní spektrometrií a proteinovými poli. Podrobné laboratorní zpracování vzorků moči a provedení laboratorních měření je detailně uvedeno v příložených publikacích.

Získané informace byly statisticky zhodnoceny za pomoci metody analýzy rozptylu (ANOVA), která umožňuje ověřit, zda na hodnotu náhodné veličiny pro určitého jedince má statisticky významný vliv hodnota některého znaku, který lze u jedince pozorovat. Tento znak musí nabývat jen konečného počtu možných hodnot (nejméně dvou) a slouží k rozdělení jedinců do vzájemně porovnávaných skupin. Kvantitativní hodnota znaku přitom nemá povahu míry (86).

Dále byla použita shluková analýza, statistická metoda, která se používá ke klasifikaci objektů. Slouží k třídění jednotek do skupin tak, aby si jednotky náležící do stejné skupiny byly podobnější než objekty z ostatních skupin (88). Všechny výpočty byly provedeny programem XLSTAT.

Ke zhodnocení výsledků jsme využili i diskriminační analýzu, která předpovídá příslušnost k určité skupině nebo kategorii na základě sledování hodnot spojitých proměnných (85). K ověření správnosti diskriminační funkce byla použita matice záměn. Všechny výpočty byly provedeny programem XLSTAT.

11.4 Stanovení nových potenciálních markerů IgAN pomocí proteomické a metabolické analýzy

Normální lidská moč obsahuje přibližně 5000 peptidů, které pochází z glomerulární filtrace, tubulární sekrece a epiteliálních buněk ledvin a močového traktu (53). Složení močového peptidomu dobře odráží fyziologické i patofyziologické procesy, které se odehrávají nejen v ledvinách, ale i v jiných orgánových soustavách. Metabolomika je nauka o studiu metabolitů, které představují konečné produkty buněčných procesů. Díky metabolomice lze zastihnout unikátní „chemické otisky“ specifických buněčných procesů. Metabolomické profilování tak může poskytnout okamžitý obraz fyziologie buněk i celého organismu. Neinvazivní

metabolomické a proteomické postupy mohou pomoci při komplexním zhodnocení funkcí uropoetického traktu i jiných orgánových systémů. Z výzkumného hlediska je močový peptidom zajímavý i proto, že moč lze snadno získat od nemocného opakovaně a neinvazivně, a podmínky pro její uchování nejsou složité, neboť moč se vyznačuje nízkou proteolytickou aktivitou ve srovnání například s krví (53).

V naší práci jsme provedli odběr vzorků moči od 20 pacientů s biopticky prokázanou IgAN a stejného počtu zdravých kontrol. Kontrolní skupina byla definována jako dospělí starší 18 let bez přítomnosti známého onemocnění ledvin nebo jiného chronického onemocnění vyžadující léčbu. V obou skupinách byli vyloučeni pacienti s aktivní infekcí, anamnézou maligního onemocnění, předchozí orgánové transplantace nebo s probíhajícím těhotenstvím. Protokol studie byl schválen etickou komisí a všichni účastníci podepsali informovaný souhlas.

Odebírali jsme vzorek středního proudu druhé porce ranní moči do sterilních zkumavek, vzorky byly centrifugovány při 3000 x g za pokojové teploty ponechány po dobu 15 min, poté pipetovány, rozděleny do alikvotů, následně uchovány při -80 stupních Celsia.

Dvacet vzorků IgAN a dvacet zdravých kontrolních vzorků bylo náhodně rozděleno do dvou biologicky shodných částí, vzorky pacientů s onemocněním IgAN byly rozděleny do skupin IgA I a IgA II, vzorky zdravých kontrol do skupin HC I a HC II. Alikvotní podíly (odpovídající 10 µg proteinu) z 10 vzorků moči byly sloučeny tak, aby se získalo 100 µg celkového obsahu bílkovin v každé skupině vzorků. Kromě toho byly připraveny dva technické vzorky z každého vzorku HC a IgA označené jako A či B, ke sledování technické variability uvnitř skupiny.

Určení množství bílkovin bylo provedeno pomocí metody značení iTRAQ. Peptidy byly odděleny metodou IEF a nano-LC s kolonou C18 a identifikovány hmotnostní spektrometrií za použití MALDI-TOF / TOF MS. Podrobné zpracování vzorků a provedení laboratorních měření je detailně uvedeno v příložených publikacích.

11.5 Zhodnocení intrarenálního barvení TLR u pacientů s IgAN

V naší práci jsme použili vzorky tkáně ledvin získané renální biopsií od 34 pacientů s IgAN, 7 pacientů s ANCA asociovanou vaskulitidou a 15 zdravých kontrol. Vzorky ledvinné tkáně od zdravých kontrol byly získány použitím nepostižené části ledvin, které byly pacientům vyoperovány z důvodu nádorového onemocnění. Histologické vzorky ledvinné tkáně pacientů s IgAN byly hodnoceny dle Oxfordské klasifikace. Pacienti s IgAN byli rozděleni do 5 skupin podle úrovně renální funkce.

Skupina	S-kreat μmol/l	PU g/24hod	eGFR ml/min/1,73 m ² MDRD
1	94	0,2	79
2	83	0,62	91
3	294	1	17
4	456	2	11
5	193	0,3	38

Tab. 4: Rozdělení pacientů podle funkce ledvin.

Všechny histologické preparáty byly použity k barvení protilátkami proti TLR. Podrobné údaje o laboratorním zpracování histologických vzorků jsou uvedeny v příložené publikaci. Statistické zhodnocení dat proběhlo metodou lineární diskriminační analýzy, která předpovídá příslušnost k určité skupině nebo kategorii na základě sledování hodnot spojitých proměnných

(85). K ověření správnosti diskriminační funkce byla použita matice záměn. Výpočet byl proveden systémem XLSTAT.

12 Výsledky

12.1 Známé klinické a laboratorní faktory ovlivňující prognózu českých pacientů s IgAN

V naší studii jsme retrospektivně sledovali laboratorní a klinické údaje 520 českých pacientů s histologicky ověřenou diagnózou IgAN, kteří byli klinicky sledováni v průměru po dobu 6 let. Děti mladší 15 let byly ze sledování vyloučeny. Nemocní byli diagnostikováni a léčeni v různých nefrologických centrech České republiky. Pozorovali jsme rozdíl v průměrném věku, hodnotách kreatininu a eGFR mezi centrem Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a ostatními nefrologickými centry. V dalších sledovaných parametrech nebyl rozdíl mezi jednotlivými centry zaznamenán.

Pomocí Coxova regresního modelu proporcionálních rizik jsme sledovali vliv celkem 5 proměnných na renální přežívání nemocných s IgAN.

Proměnná	Koeficient	Standardní odchylka	Koeficient/S.E.
Hypertenze	0,7415	0,3262	2,2734
Pohlaví	0,1404	0,2749	0,5107 NS
Věk	-0,2122	0,2999	-0,7075 NS
Proteinurie	0,6781	0,1757	3,8590
eGFR	-1,1306	0,2025	- 5,5839

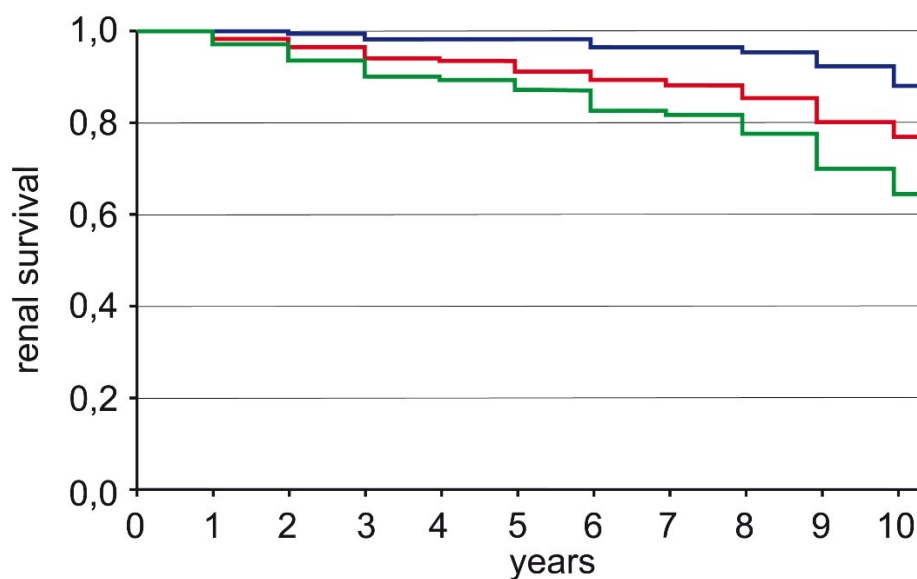
Tab. 5: Hodnocení hypertenze, pohlaví, věku, proteinurie a eGFR na přežívání funkce ledvin pomocí Coxova regresního modelu proporcionálních rizik.

V naší kohortě českých nemocných s IgAN jsme potvrdili signifikantní regresní koeficient pro hypertenzi, eGFR a proteinurii. Pomocí krokového algoritmu pro tyto 3 proměnné bylo zjištěno, že hypertenzní pacienti mají 2,1krát vyšší riziko selhání funkce ledvin než pacienti s normálním krevním tlakem. Pacienti s proteinurií > 1 g/24hod mají 1,97krát vyšší riziko renálního selhání a nemocní se sníženou funkcí ledvin v pásmu CKD2 (tedy eGFR 1,49-1,0ml/s) měli 3,1krát vyšší pravděpodobnost selhání renální funkce ve srovnání s pacienty s normálními parametry renálních funkcí.

Proměnná	Koeficient	Standardní odchylka	Koeficient/S.E.	Exp(koeficient) = OR
Hypertenze	0,7050	0,3232	2,1816	2,09
Proteinurie	0,6764	0,1726	3,9193	1,97
eGFR	-1,1315	0,2020	-5,6014	3,09

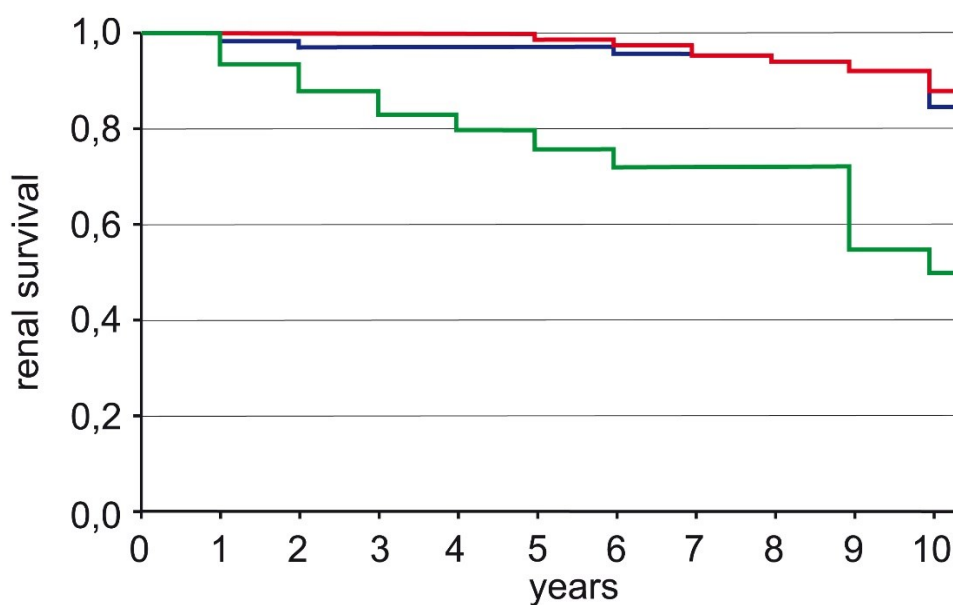
Tab. 6: Výsledky použití krokového algoritmu při zkoumání vlivu vybraných proměnných (hypertenze, proteinurie a eGFR) na renální přežívání pacientů.

Celkové desetileté renální přežívání bylo 77,1 %. Byl zaznamenán rozdíl v renálním přežívání mezi centrem VFN (64,5 %) a ostatními českými nefrologickými centry (88,3 %) ($P < 0,001$).



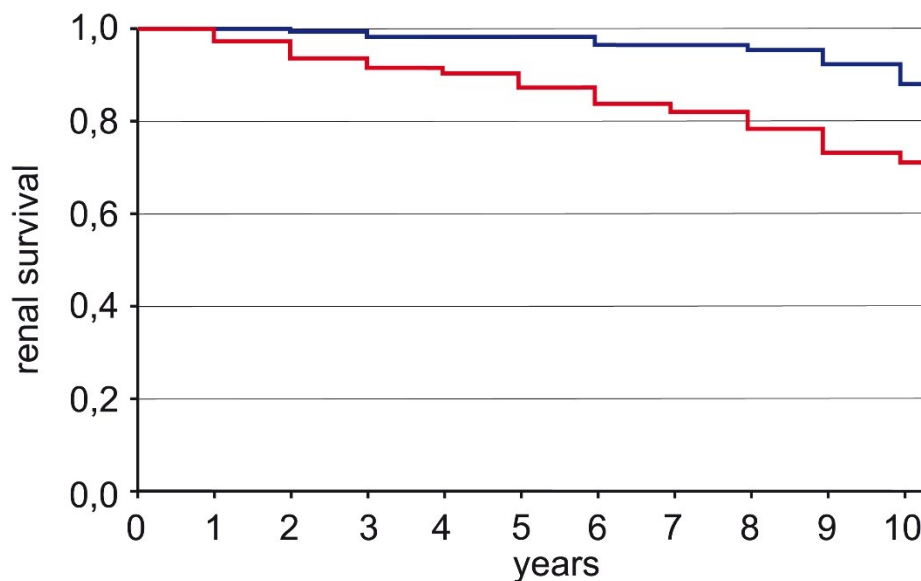
Obr. 5: Kaplan-Meierovy křivky celkového renálního přežívání u českých pacientů s IgAN (červená linie – celkové deseti-leté přežívání ledvin - 77,1 %, zelená linie – deseti-leté přežívání v centru VFN – 64,5 %, modrá linie – deseti-leté přežívání v ostatních centrech ČR – 88,3 %), log rank test: $P < 0,001$).

Potvrdili jsme tak snížené renální přežívání mezi českými pacienty s IgAN, hypertenzí, proteinurií vyšší než 1 g/24hod a renální insuficiencí.

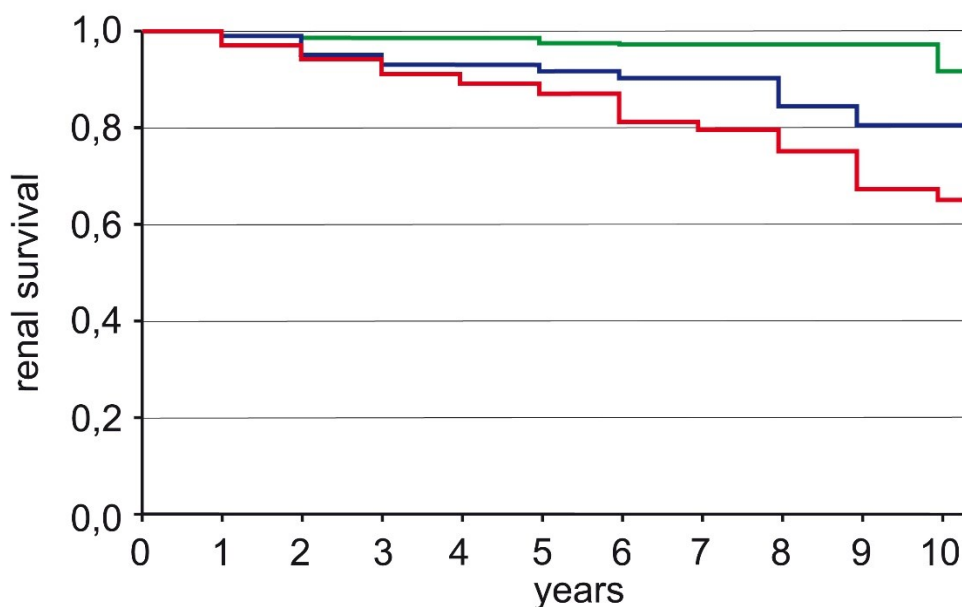


Obr. 6: Kaplan-Meierovy křivky znázorňují deseti-leté renální přežívání nemocných v závislosti na eGFR. Modrá linie - skupina nemocných s $eGFR \geq 1,5 \text{ ml/s}$ (dopovídá deseti-letému renálnímu přežívání 89%), červená linie – skupina nemocných s $eGFR 1-1,49 \text{ ml/s}$

(odpovídá deseti-letému renálnímu přežívání 85%), zelená linie – skupina nemocných s eGFR 0,5-0,99ml/s (odpovídá deseti-letému renálnímu přežívání 50%). $P < 0,001$.



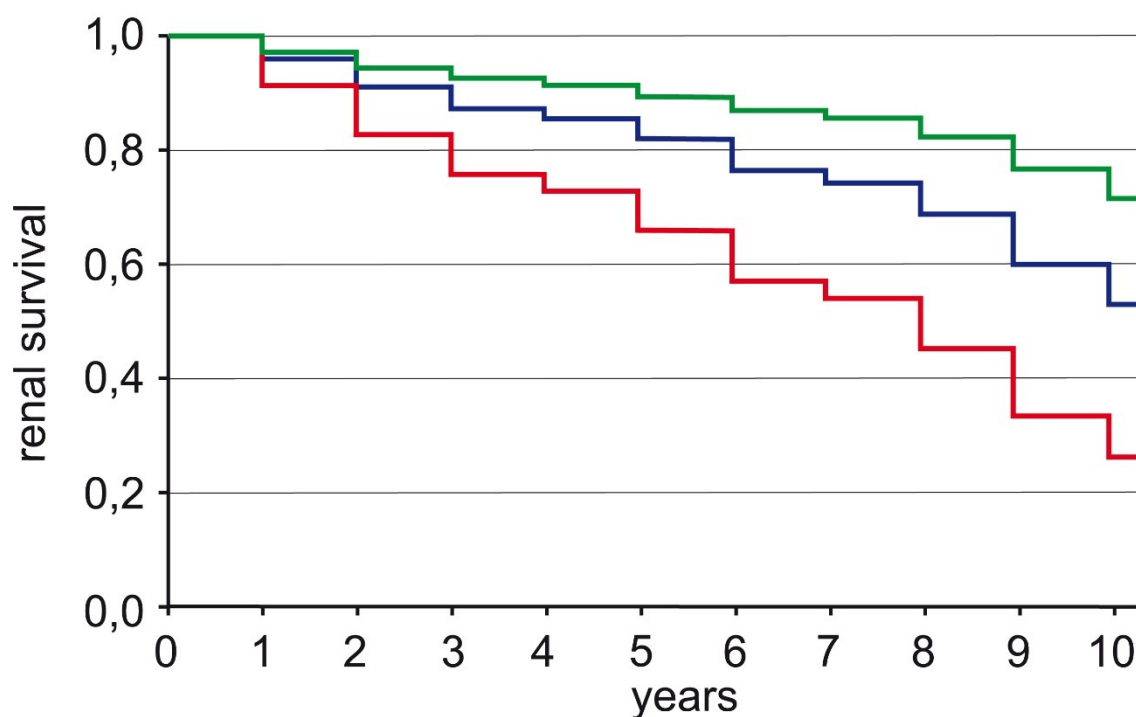
Obr. 7: Kaplan Meierovy křivky znázorňují pravděpodobné deseti-leté renální přežívání nemocných v závislosti na současné arteriální hypertenzi. Červená křivka – deseti-leté přežívání nemocných s arteriální hypertenzí dosahuje 71 %, modrá křivka – deseti-leté přežívání pacientů bez arteriální hypertenze odpovídá 88 %. $P < 0,001$.



Obr. 8: Kaplan Meierovy křivky znázorňují pravděpodobné deseti-leté renální přežívání v závislosti na proteinurii. Zelená linie – proteinurie < 1 g/24 hod dosahuje 92 %, modrá linie – pravděpodobné deseti-leté renální přežívání u pacientů s proteinurií < 2 g/24 hod odpovídá 81%,

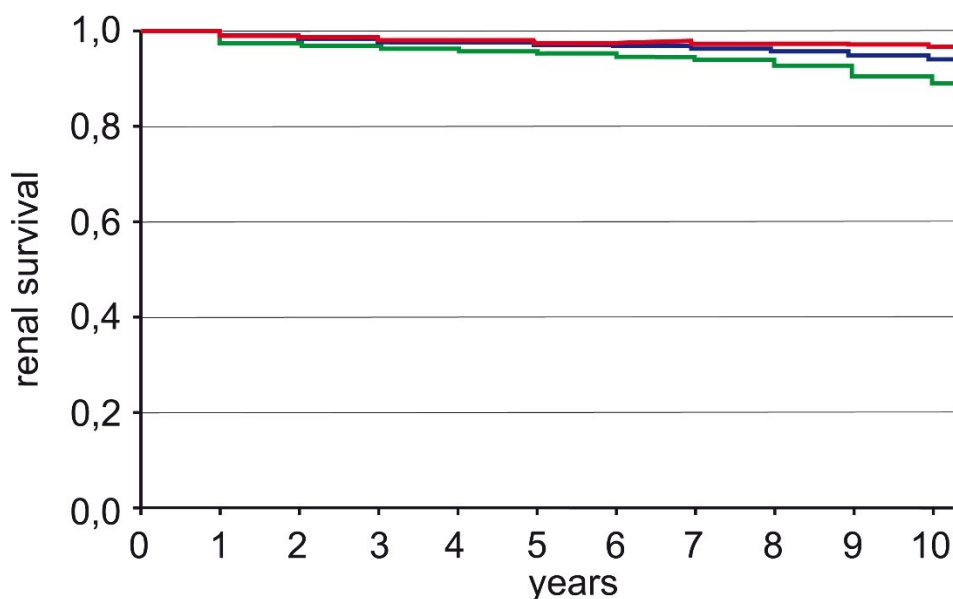
červená linie – nemocní s proteinurií > 2 g/24 hod – pravděpodobné deseti-leté renální přežívání je 65 %. $P < 0,001$.

Nemocní s funkcí ledvin odpovídající stupni CKD3 (eGFR 0,99-0,5ml/s) mají významně lepší renální přežívání při proteinurii pod 1 g/24hod ve srovnání s nemocnými s proteinurií vyšší.



Obř. 9: Kaplan Meierovy křivky ukazují deseti-leté renální přežívání nemocných s eGFR < 1 ml/s a různou hodnotou proteinurie: zelená linie – proteinurie < 1 g/24 hod, deseti-leté renální přežívání odpovídá 77 %, modrá linie – proteinurie ≥ 1 a současně < 2 g/24 hod – deseti-leté renální přežívání odpovídá 59 %, červená linie – proteinurie > 2 g/24 hod – deseti-leté renální přežívání odpovídá 35 %. $P < 0,001$.

Pacienti s normální funkcí ledvin a proteinurií < 1 g/24 hod vykazují významně lepší parametry renálního přežívání ve srovnání s nemocnými se stejnou funkcí ledvin a proteinurií > 1 g/24 hod.



Obr. 10: Kaplan Meierovy křivky pravděpodobného deseti-letého renálního přežívání při eGFR >1,5ml/s a různou úrovní proteinurie. Červená linie – proteinurie <1 g/24hod, pravděpodobné deseti-leté renální přežívání je 98 %, modrá linie – proteinurie ≥1 a současně <2 g/24hod, pravděpodobné deseti-leté renální přežívání odpovídá 95 %, zelená linie – proteinurie >2 g/24hod, pravděpodobné deseti-leté renální přežívání činí 91 %. P <0,001.

Progresi renální funkce u pacientů s IgAN jsme v naší práci hodnotili za použití Bartošíkova vzorce (87). K předpovědi poklesu eGFR využívá Bartošíkova formule hodnoty průměrného středního arteriálního tlaku a proteinurie během prvních dvou let sledování (87). K analýze progresu funkce ledvin jsme použili klinická data na konci sledování od 516 pacientů s IgAN z našeho souboru, 4 pacienti byli pro neúplnost údajů z výpočtu vyloučeni.

Srovnávali jsme skutečnou progresi zhoršení renální funkce na základě eGFR získané na konci sledování (pro muže byla hodnota 1,14ml/s, pro ženy 0,9ml/s) a predikci zhoršení funkce ledvin vypočtenou dle Bartošíkova vzorce a pomocí McNemarova testu. V tomto srovnání jsme neshledali významný rozdíl mezi reálnou progresí funkce ledvin zjištěnou na základě eGFR na konci sledování a progresí vypočtenou dle Bartošíkovy formule.

12.2 Zhodnocení vztahu Gd-IgA1 a anti-Gd-IgA1 k aktivitě onemocnění, vývoji renální funkce a prognózy u českých pacientů s IgAN

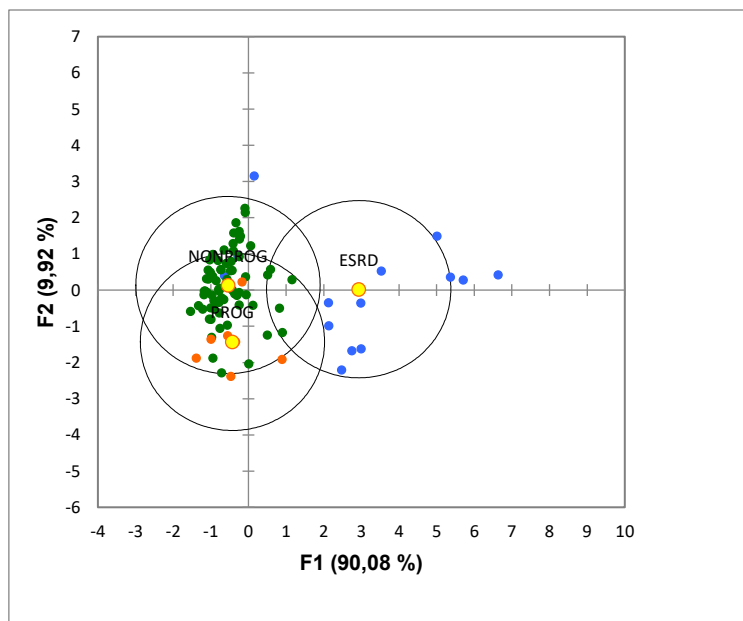
Soubor 91 pacientů s IgAN jsme rozdělili podle renální funkce na konci sledovaného období nebo její změny v průběhu sledování na 3 skupiny: neprogresoři (stabilní funkce ledvin, $n = 70$), progresoři (pokles eGFR $\geq 50\%$ od výchozí hodnoty a konečná eGFR $\geq 15 \text{ ml/min/1,73m}^2$, $n = 7$) a ESRD (pacienti, kteří dosáhli selhání ledvin, eGFR $\leq 15 \text{ ml/min/1,73m}^2$ nebo zahájili léčbu nahrazující funkce ledvin, $n = 14$). V době biopsie ledvin jsme ve vzorcích séra měřili IgA, Gd-IgA1 a anti-Gd-IgA1 a výpočtem stanovili eGFR dle MDRD.

V souboru 91 pacientů rozdělených do 3 skupin (progresoři, neprogresoři a ESRD) jsme provedli diskriminační analýzu s využitím hodnoty eGFR a 5 sérových biomarkerů – IgA (mg/ml), Gd-IgA1 (U/l ug IgA bez neuraminidázy), Gd-IgA1 (U/ml bez neuraminidázy), Gd-IgA1 (U/l ug IgA s neuraminidázou), Gd-IgA1 (U/ml s neuraminidázou) a anti-Gd-IgA1 (U/ml).

Proměnná	Neprogresoři + progresoři	ESRD
Procento všech subjektů (%)	85	15
S-kreat (μmol/l)	149 (83)	517 (254)
eGFR (MDRD, ml/min/1,73 m ²)	62 (37)	24 (34)
Proteinurie (g/24 h)	2,2 (2,1)	2,7 (2,7)
Sérové IgA (μg/ml)	4 997 (2 130)	5 420 (3 179)
Sérové Gd-IgA1 (U/1 μg IgA) bez neuraminidázy	111 (63)	139 (59)
Sérové Gd-IgA1 (U/1 μg IgA) s neuraminidázou	482 (289)	405 (179)
Sérové Gd-IgA1 (U/ml) bez neuraminidázy	535 813 (307 945)	750 295 (518 475)
Sérové Gd-IgA1 (U/ml) s neuraminidázou	2 365 778 (1 473 096)	2 179 918 (1 467 646)

Tab.: 7 – Vyhodnocení parametrů kombinované skupiny IgAN progresoři+ neprogresoři versus skupina IgAN ESRD

Hodnoty zobrazují mediány a směrodatnou odchylku: neprogresoři (pacienti se stabilními parametry funkce ledvin), progresoři (pacienti s klesající eGFR ≥ 50 % proti vstupním hodnotám), ESRD (pacienti s konečným stádiem onemocnění ledvin dosaženým během sledování a pacienti s eGFR ≤ 15 ml/min/1,73 m² na konci sledování nebo pacienti se zahájenou náhradní funkcí ledvin během sledování).



Obr. 11: Diskriminační analýza pro všechny 3 skupiny pacientů s IgAN (neprogresoři (NONPROG) – zeleně, progresoři (PROG) - oranžově, ESRD – modře) a všech 5 sledovaných parametrů (eGFR použitím MDRD v ml/min/1,73m², sérové IgA (mg/ml), sérová Gd-IgA1 (U/l ug IgA bez neuraminidázy), sérová Gd-IgA1 (U/ml bez neuraminidázy), Gd-IgA1 (U/l ug IgA s neuraminidázou), Gd-IgA1 (U/ml s neuraminidázou). Neprogresoři ((NONPROG) - pacienti se stabilní funkcí ledvin), progresoři ((PROG) - pacienti s poklesem funkce ledvin ≥ 50 % během sledování), ESRD (pacienti se selháním ledvin nebo pacienti se zahájenou náhradní funkcí během sledování).

U 14 nemocných s ESRD byly zjištěny signifikantní hodnoty Gd-IgA1 při použití měření s nativní Gd-IgA1 bez ošetření neuraminidázou (U/l μg IgA), ale ne pro Gd-IgA1 po ošetření neuraminidázou (U/l μg IgA) (viz Tab. 8 a Obr. 11).

Proměnná	p value***
S-kreat ($\mu\text{mol/l}$)	0,0003
eGFR (ml/min/1,73m^2)	0,003
IgA ($\mu\text{g/ml}$)	0,195
Gd-IgA1 (U/l $\mu\text{g IgA}$)*	0,049
Gd-IgA1 (U/ml)*	0,120
Gd-IgA1 (U/l $\mu\text{g IgA}$) **	0,227
Gd-IgA1 (U/ml)**	0,227

Tab. 8: Mediánový test (Mood test) pro srovnání pacientů s IgAN, kteří dosáhli ESRD během sledování versus pacienti s IgAN bez ESRD pro vybrané proměnné.

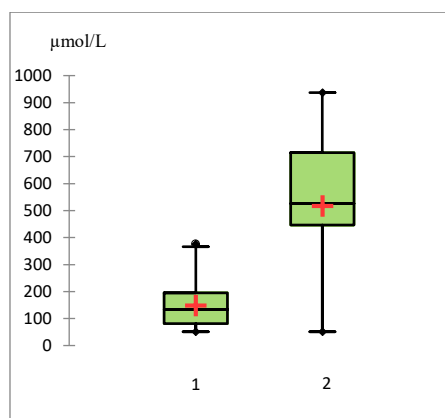
* sérové Gd-IgA1 bez ošetření neuraminidázou

** sérové Gd-IgA1 ošetřené neuraminidázou

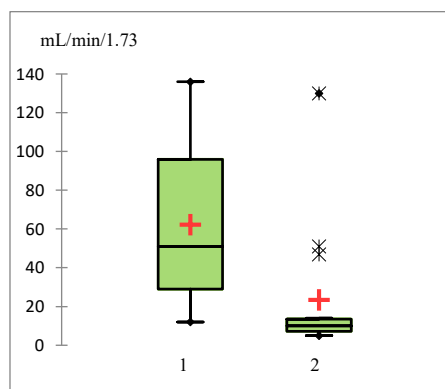
*** Hodnoty p znamenají riziko odmítnutí nulové hypotézy (mediány jsou všechny stejné). Úroveň důvěryhodnosti je 90 %, (mezní hodnota 0,1). Žlutě zvýrazněná čísla označují statisticky významné hodnoty p.

S-kreat – sérový kreatinin ($\mu\text{mol/l}$), eGFR (MDRD, ml/min/1,73m^2)

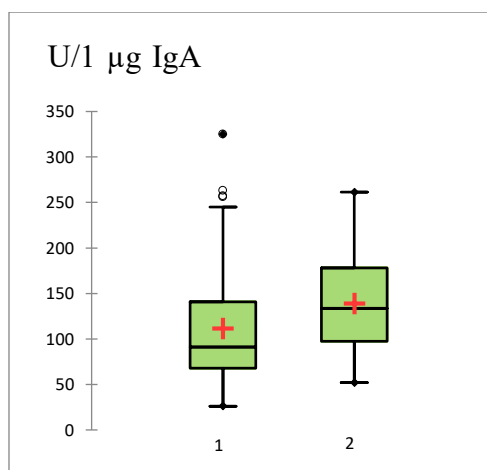
S-kreat



eGFR (MDRD)



Gd-IgA1 (bez neuraminidázy)



Obr. 12: Box and whiskers plots pro vybrané parametry progresorů a neprogresorů (pacientů s IgAN bez ESRD - skupina 1) a u pacientů s renálním selháním v průběhu sledování (skupina 2).

Výše uvedenými metodami jsme identifikovali pacienty s rizikem závažné progresse onemocnění, ale nedokázali jsme rozlišit pacienty se stabilní a progresivní formou choroby. V dalším měření jsme vyloučili nemocné s IgAN a ESRD (viz Tab. 7) a zaměřili jsme se na skupinu progresorů v porovnání s pacienty se zachovalou renální funkcí v průběhu sledování (n = 77). Nemocné s progredující formou IgAN se podařilo odlišit signifikantně zvýšenou hladinou sérové Gd-IgA1 v obou měřeních (tedy po ošetření neuraminidázou i bez neuraminidázy).

Proměnná	p value***
S-kreat ($\mu\text{mol/l}$)	0,045
eGFR (ml/min/1,73m^2)	0,049
IgA ($\mu\text{g/ml}$)	0,155
Gd-IgA1 (U/l $\mu\text{g IgA}$)*	0,155
Gd-IgA1 (U/ml)*	0,005
Gd-IgA1 (U/l $\mu\text{g IgA}$) **	0,155
Gd-IgA1 (U/ml)**	0,005

Tab. 9. Mediánový test (Mood test) srovnávající parametry pro skupinu neprogresorů (n = 70) a skupinu progresorů (n = 7).

* sérové Gd-IgA1 bez ošetření neuraminidázou

** sérové Gd-IgA1 ošetřené neuraminidázou

*** Hodnoty p znamenají riziko odmítnuté nulové hypotézy (mediány jsou všechny stejné). Hladina významnosti je 90 %, (mezní hodnota 0,1). Žlutě zvýrazněná čísla označují statisticky významné hodnoty p.

S-kreat – sérový kreatinin ($\mu\text{mol/l}$), eGFR (MDRD, ml/min/1,73m^2).

Následně jsme provedli korelaci histologických nálezů renálních biopsií dle Oxfordské MEST klasifikace s klinickými a biochemickými nálezy ve skupině 77 pacientů (progresoři a neprogresoři). Pacienti, kteří dosáhli terminálního selhání ledvin byli z této korelace vyloučeni. U jednotlivých parametrů klasifikace MEST jsme potvrdili souvislost mezi skóre E a sérovou hladinou IgA a Gd-IgA1(U/ml bez neuraminidázy) a eGFR (viz Tab. 10).

Proměnná	p value***
S-kreat ($\mu\text{mol/l}$)	0,028
eGFR (ml/min/1,73m^2)	0,043
IgA ($\mu\text{g/ml}$)	0,003
Gd-IgA1 (U/1 μg IgA)*	0,107
Gd-IgA1 (U/ml)*	0,061
Gd-IgA1 (U/1 μg IgA) **	0,179
Gd-IgA1 (U/ml)**	0,107

Tab. 10: Hodnocení 2 skupin (neprogresoři n = 70 a progresoři n = 7) pro parametr E Oxfordské klasifikace, ostatní parametry (M, S, T) nevyšly statisticky významné.

* sérové Gd-IgA1 bez ošetření neuraminidázou

** sérové Gd-IgA1 ošetřené neuraminidázou

***Hodnoty p znamenají riziko odmítnutí nulové hypotézy (mediány jsou všechny stejné). Hladina významnosti je 90 %, (mezní hodnota 0,1). Žlutě zvýrazněná čísla označují statisticky významné hodnoty p.

S-kreat – sérový kreatinin ($\mu\text{mol/l}$), eGFR (MDRD, ml/min/1,73m^2).

Kompozitní skóre (M+E+S+T) bylo asociováno s hladinou sérové IgA a Gd-IgA1 (vyjádřené jako relativní stupeň deficitu galaktózy měřené na nativním IgA1, tedy bez neuraminidázy) a eGFR (viz Tab. 11).

Proměnná	p value***
S-kreat (μmol/l)	<0,0001
eGFR (ml/min/1,73m ²)	0,0001
IgA (μg/mL)	0,024
Gd-IgA1 (U/1 μg IgA)*	0,101
Gd-IgA1 (U/mL)*	0,513
Gd-IgA1 (U/1 μg IgA) **	0,534
Gd-IgA1 (U/mL)**	0,147

Tab. 11: Zhodnocení 2 skupin pacientů s IgAN (neprogresoři n = 70 a progresoři n = 7) v souvislosti s vlivem kompozitního skóre Oxfordské klasifikace MEST

* sérové Gd-IgA1 bez ošetření neuraminidázou

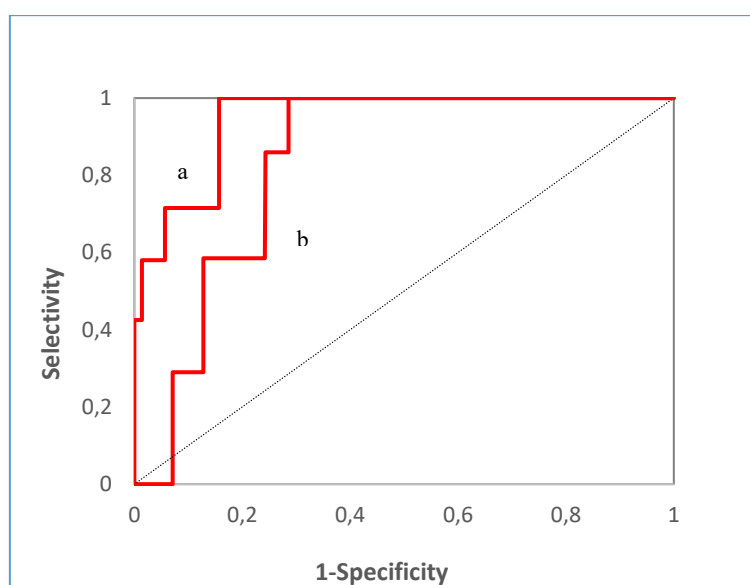
** sérové Gd-IgA1 ošetřené neuraminidázou

*** Hodnoty p znamenají riziko odmítnutí nulové hypotézy (mediány jsou všechny stejné). Hladina významnosti je 90 %, (mezní hodnota 0,1). Žlutě zvýrazněná čísla označují statisticky významné hodnoty p.

S-kreat – sérový kreatinin (μmol/l), eGFR (MDRD, ml/min/1,73m²).

ROC křivka (AUC 0,936) s použitím hodnoty eGFR, biochemických parametrů (Gd-IgA1, IgA) a histologického hodnocení (Oxfordská klasifikace) ukázala, že tyto parametry (histologické nálezy dle Oxfordské klasifikace, hladina sérové Gd-IgA1 a eGFR) umožní rozlišit skupinu neprogresorů od progresorů (p hodnota vybraných proměnných: eGFR 0,028, hladina sérového IgA 0,014, sérová hladina Gd-IgA1 (U/ml) jako relativní stupeň deficiencie

galaktózy, měřeno pro IgA bez ošetření neuraminidázou 0,004, sérová hladina Gd-IgA (U/ml) po ošetření neuraminidázou 0,047) (Obr. 13a). ROC křivka s použitím klinických (eGFR), histologických parametrů (Oxford skóre) dosahuje AUC pouze 0,836 (Obr. 13 b).



Obr. 13 a: ROC křivka (Receiver operating characteristic curve) pro srovnání neprogresorů a progresorů (eGFR, biomarkery Gd-IgA1, Oxfordská klasifikace MEST – jednotlivé parametry M, E, S, T). Plocha pod křivkou AUC = 0,936. Přesnost rozlišení je 90,8 %.

eGFR (MDRD, ml/min/1,73 m²); sérové IgA (μg/mL); sérové Gd-IgA1 (U/1 μg IgA) bez neuraminidázy; sérové Gd-IgA1 (U/1 μg IgA) s neuraminidázou; sérové Gd-IgA1 (U/ml) bez neuraminidázy; sérové Gd-IgA1 (U/ml) s neuraminidázou.

Obr. 13 b: ROC křivka (Receiver operating characteristic (ROC) pro neprogresory versus progresory (eGFR, Oxfordská klasifikace MEST). Plocha pod křivkou AUC = 0,836.

eGFR (MDRD, ml/min/1,73 m²).

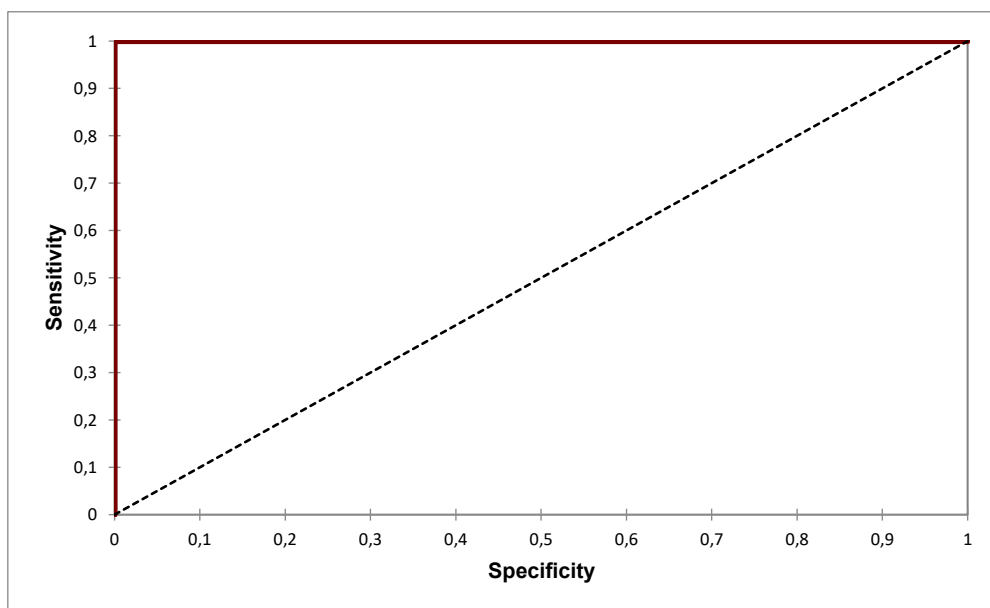
Využitím softwaru XLSTAT jsme vytvořili logistický model ke zhodnocení 77 pacientů s IgAN s úrovní renální funkce eGFR ≥60 ml/min/1,73m² (skupina 1, n = 35) a s eGFR ≤60 ml/min/1,73m² (skupina 2, n = 42) v době renální biopsie i v průběhu sledování (viz Tab. 12).

Skupina	Počet pacientů (n)	eGFR	M0	M1	E0	E1	S0	S1	T0	T1	T2
1	35	97(23)	23	77	51	49	11	89	83	14	3
2	42	33(14)	10	90	38	62	0	100	24	55	21

Tab. 12: Renální funkce a histologické hodnocení podle Oxfordské klasifikace ve 2 skupinách pacientů s IgAN s různou funkcí ledvin: s eGFR (MDRD) ≥ 60 ml/min/1,73 m² (skupina 1) nebo eGFR < 60 ml/min/1,73 m² (skupina 2) v době renální biopsie.

eGFR – je uvedena průměrná hodnota (SD). Skupina 1 – pacienti s IgAN a eGFR ≥ 60 ml/min/1,73 m² v době renální biopsie a v průběhu sledování, s průměrnou hodnotou eGFR 97 ml/min/1,73 m². Skupina 2 – pacienti s IgAN a eGFR < 60 ml/min/1,73 m² v době renální biopsie a v průběhu sledování, s průměrnou hodnotou eGFR 33 ml/min/1,73 m². Oxfordská klasifikace – histologické skóre je uvedeno pro každou skupinu, hodnoty (M0/1, E0/1, S0/1, T0/1/2) jsou uvedeny v procentech pacientů s IgAN v každé skupině. eGFR – odhadovaná glomerulární filtrace vypočítaná dle MDRD (průměr, ml/min/1,73 m²). SD – standardní odchylka.

Na obrázku 14 jsou znázorněny ROC křivka a regresní model pro vybrané parametry, které byly významné dle diskriminační analýzy. Regresní model byl použit pro kohortu 77 pacientů a přesnost rozlišení byla 100 % (Obr. 14).



Obr. 14: ROC křivka pro 2 skupiny (eGFR, sérová IgG autoprotilátka specifická pro Gd-IgA1 (AB-IgA)). Plocha pod křivkou AUC = 1,00. Přesnost rozlišení je 100 %.

Skupina 1 (n = 35), eGFR > 60 ml/min/1,73m² v době renální biopsie, skupina 2 (n = 42), eGFR < 60 ml/min/1,73m² v době renální biopsie.

Rovnice předpovědi z logistické regrese (předpovídá pravděpodobnost výběru skupiny 1):

$$\text{Pred}(\text{group } 1) = 1 / (1 + \exp(-(1517,5 - 1,2\text{E-}02 * \textit{AB-IgA} - 24,9 * \textit{eGFR})))$$

Dále jsme zjišťovali, zda celkové IgA a Gd-IgA1 jsou charakteristické pro 35 pacientů s IgAN s eGFR > 60 ml/min/1,73m² době biopsie ledvin i v průběhu sledování (u pacientů s pravděpodobně mírnou formou onemocnění s nízkým rizikem progresu) ve srovnání se skupinou 42 pacientů s eGFR < 60 ml/min/1,73m² v době biopsie a během sledování. Překvapivě žádný z těchto markerů nedokázal uvedené skupiny nemocných odlišit. Následně jsme rozšířili měření o sérové IgG protilátky specifické proti Gd-IgA1 a zjistili jsme, že tento marker je schopen odlišit výše uvedené dvě skupiny pacientů (viz Obr. 14 a Obr. 15, Tab. 13).

Proměnná	p value
S-kreat ($\mu\text{mol/l}$)	<0,0001
eGFR (ml/min/1,73 m^2)	<0,0001
PU (g/24 hod)	0,176
IgA ($\mu\text{g/mL}$)	0,190
Gd-IgA1 ($\text{U/1 } \mu\text{g IgA}$)*	0,101
Gd-IgA1 (U/ml)*	0,117
Gd-IgA1 ($\text{U/1 } \mu\text{g IgA}$) **	0,686
Gd-IgA1 (U/ml)**	0,545
IgG autoprotílátka specifická pro Gd-IgA1 (U/ml)	0,003
S-kreat _f ($\mu\text{mol/l}$)	<0,0001
eGFR _f (ml/min/1,73 m^2)	<0,0001
PU _f (g/24hod)	<0,0001

Tab. 13: Mann-Whitney test pro různé parametry u 2 skupin nemocných s IgAN a eGFR ≥ 60 ml/min/1,73 m² (skupina 1) nebo eGFR <60 ml/min/1,73 m² (skupina 2).

* sérové Gd-IgA1 bez neuraminidázy

** sérové Gd-IgA1 po ošetření neuraminidázou

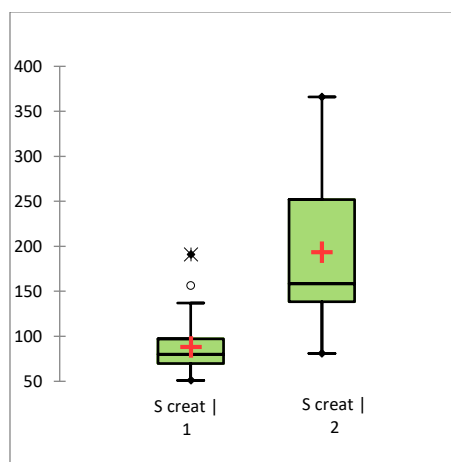
Skupina 1 (n=35), eGFR ≥ 60 ml/min/1,73 m², skupina 2 (n=42), eGFR <60 ml/min/1,73 m²

S-kreat_f, eGFR_f, PU_f – finální hodnoty na konci doby sledování (3,5 let)

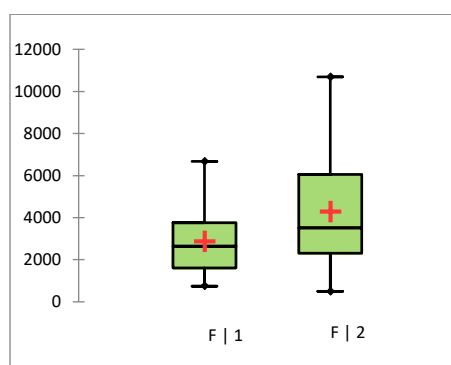
S-kreat – sérový kreatinin ($\mu\text{mol/l}$), eGFR (MDRD, ml/min/1,73 m²), PU - proteinurie (g/24 h).

Zvýrazněné hodnoty jsou statisticky významné P hodnoty (cut-off 0,1).

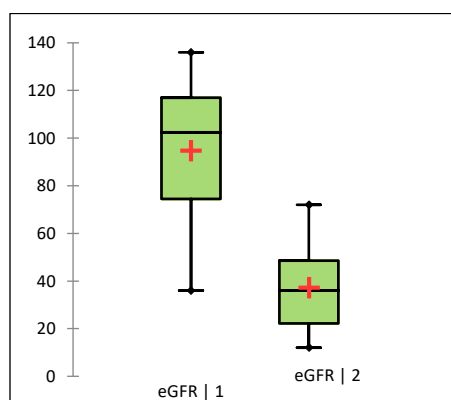
S-kreat



IgG specifické protilátky proti Gd-IgA1



eGFR



Obr. 15: Box and whiskers plots – porovnává vybrané proměnné pro skupinu 1 a skupinu 2

S-kreat – sérový kreatinin ($\mu\text{mol/l}$); eGFR (MDRD, ml/min/1,73 m^2); sérová IgG protilátka proti Gd-IgA1 (U/ml). Skupina 1 ($n = 35$), eGFR $>60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ v době biopsie ledvin; skupina 2 ($n = 42$), eGFR $<60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ v době biopsie ledvin.

U skupiny 1 pacientů s IgAN (skupina s eGFR $> 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$) byla hladina sérové IgG proti Gd-IgA1 nižší než u skupiny 2 s eGFR $<60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ ($P = 0,003$), viz Tab. 14.

Proměnná	Skupina 1	Skupina 2	p value***
S-kreat ($\mu\text{mol/l}$)	83	212	$<0,0001$
S-kreat _{fl} ($\mu\text{mol/l}$)	88	237	$<0,0001$
eGFR (ml/min/1,73 m^2)	96	33	$<0,0001$
eGFR _{fl} (ml/min/1,73 m^2)	85	34	$<0,0001$
eGFR (ml/min/1,73 m^2)	-13 %	-3 %	
PU (g/24hod)	2,09	2,29	0,486
PU _{fl} (g/24hod)	0,73	1,69	0,026
PU (g/24hod)	-65 %	-26 %	
IgA ($\mu\text{g/ml}$)	4756	5226	0,190
Gd-IgA1 (U/1 $\mu\text{g IgA}$)*	100	115	0,101
Gd-IgA1 (U/ml)*	468804	567790	0,117
Gd-IgA1 (U/1 $\mu\text{g IgA}$) **	466	477	0,686
Gd-IgA1 (U/ml)**	2210341	2371748	0,545
IgG Ab	2694	4396	0,003
S kreat _{l2} ($\mu\text{mol/l}$)	91		

Proměnná	Skupina 1	Skupina 2	p value***
eGFR ₁₂ (ml/min/1,73m ²)	77		
PU ₁₂ (g/24hod)	0,6		

Tab. 14: Průměrné hodnoty různých proměnných parametrů ve skupině nemocných s vysokou eGFR v průběhu sledován (skupina 1: pacienti s eGFR ≥ 60 ml/min/1,73 m²) ve srovnání se skupinou 2 (pacienti s eGFR <60 mL/min/1,73 m²).

* sérové Gd-IgA1 bez neuraminidázy

** sérové Gd-IgA1 po ošetření neuraminidázou

*** Hodnoty p znamenají riziko odmítnutí nulové hypotézy (mediány jsou všechny stejné). Hladina významnosti je 90 %, (mezní hodnota 0,1). Žlutě zvýrazněná čísla označují statisticky významné hodnoty p.

S-kreat – sérový kreatinin (μmol/l), eGFR (MDRD, ml/min/1,73m²).

12.3 Výzkum močových markerů a stanovení potenciálních specifických biomarkerů pro pacienty s IgAN

V pilotní studii jsme se zaměřili na zhodnocení potenciálních močových biomarkerů u skupiny 19 pacientů s různými druhy glomerulopatií (lupusová nefritida, IgAN, membranózní nefropatie, ANCA asociovaná vaskulitida a diabetická nefropatie) a nálezy jsme srovnávali se skupinou 19 zdravých kontrol. Ke kvantitativnímu zhodnocení markerů jsme použili různé experimentální techniky (imunoafinita-MALDI MS, protein array, LC-MS/MS analýza). Testování močových vzorků zahrnovalo neselektivní analýzu nízkomolekulárních metabolitů za použití selektivního sledování reakce LC-MS/MS a cílenou analýzu všech vybraných proteinů a heparan sulfátu (89-92). Podrobné podmínky měření jsou uvedeny v tabulkách 15 a 16.

Analyt	SRM přechod Q₁--> Q₃	CID energie (eV)
o-Tyrosin	300—>180	15
3-Chlorotyrosin	334—>214	16
3-Nitrosine	345—>225	14
8-Hydroxyguanosin	418—>298	15
8-Hydroxy-2-deoxyguanosin	402—>282	15

Tab. 15: Vybrané reakce sledující přeměny sloučenin derivovaných 3- aminopyridyl-N-hydroxysuccinimidyl karbamátovým činidlem.

Q₁-prekurzorový iont, Q₃-výsledný iont, SRM – selected reaction monitoring – sledování vybraných reakcí, CID – collision-induced dissociation – disociace indukovaná kolizí.

Analyt	SRM přechod Q ₁ --> Q ₂	CID energie (eV)
Hexanal	214--> 155	16
Heptanal	228—>169	16
Oktanal	242—>183	16
Nonanal	256--> 197	16
Decanal	270—>211	16
Undecanal	284—>225	16
Dodecanal	298—>239	17
Malondialdehyd	169—>101	8
4-Hydroynonenal	273—>214	15
4-Hydroxyhexenal	231—>172	15
8- isoprostan-PGF _{2α}	471—>412	15
Leukotrien B ₄	454—>395	17
Leukotrien C ₄	744—>685	14
Leukotrien D ₄	615—>556	15
Leukotrien E ₄	558—>499	15

Tab. 16: Vybrané reakce sledující přeměny sloučenin derivovaných Girardovým činidlem T.

Q₁-prekurzorový iont, Q₂-výsledný iont, SRM – selected reaction monitoring – sledování vybraných reakcí, CID – collision-induced dissociation – disociace indukovaná kolizí.

Girardovo činidlo T, (carboxymethyl) trimethyl amonium chlorid hydrazid.

Srovnávali jsme průměrné koncentrace všech analytů ve vzorcích moči v následujících třech skupinách: zdravé kontroly (skupina 1, n=19), pacienti s IgAN (skupina 2, n=11) a pacienti s jinou glomerulopatií (skupina 3, n=8). Koncentrace analytů v moči u jednotlivých skupin jsou zaznamenány v tabulce 17. Při použití analýzy rozptylu (ANOVA) a ROC křivky jsme zjistili, že ani jeden biomarker není schopen rozlišit uvedené tři skupiny, proto jsme následně použili kombinaci několika biomarkerů v panelu.

Analyt (ng/ml¹, pg/ml², µg/ ml³)	skupina 1	skupina 2	skupina 3
Malondialdehyd ¹	22,1	32,3	31,2
4-Hydroxyhexenal ¹	13,1	29,4	28,9
4-Hydroxynonehexal ¹	23,9	33,3	35,8
Hexanal ¹	15,4	28,3	24,2
Heptanal ¹	22,5	32,1	28,9
Oktanal ¹	9,0	15,1	13,6
Nonanal ¹	12,2	15,3	14,6
Decanal ¹	9,0	13,8	12,6
Undecanal ¹	5,6	7,2	6,9
Dodecanal ¹	6,6	8,1	7,5
3-Nitrotyrosine ²	52,5	76,4	74,6
8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin ²	190,2	341,8	303,3
8-Hydroxyguanosin ²	190,2	337,9	284,1
5-Hydroxymethyluracil ²	90,1	168,0	156,8
o-Tyrosin ²	54,6	91,4	82,6
3-Chlortyrosin ²	23,8	50,2	44,5

Analyt (ng/ml ¹ , pg/ml ² , µg/ ml ³)	skupina 1	skupina 2	skupina 3
Leukotrien B ₄ ²	151,3	381,2	293,1
8-Isoprostane ²	20,5	43,4	38,6
Leukotrien E ₄ ²	120,0	135,5	126,0
Leukotrien D ₄ ²	55,6	65,1	62,8
Leukotrien C ₄ ²	63,9	76,4	71,6
Proteomické markery			
Interleukin 6 ²	38,8	110,5	78,8
Interleukin 8 ²	18,3	97,4	60,6
Monocytní chemotaktický protein-1 ¹	1,6	5,2	4,9
Epidermální růstový faktor ¹	5,1	2,9	3,2
α1-antitrypsin ¹	16,0	55,0	40,6
IgA-Uromodulin ¹	53,8	518,0	221,9
Galaktóza deficientní IgA1 ¹	49,8	186,7	141,3
Solubilní trasferin ¹	10,0	41,2	37,5
LG3 fragment endorepellinu ¹	14,0	53,2	63,9
Tumstatin ²	72,5	158,5	167,8
Endostatin ²	75,2	192,7	178,1
Heparan sulfát ³	0,1	2,1	1,1

Tab. 17: Průměrné hodnoty všech analytů v jednotlivých skupinách.

Skupina 1 – zdravé kontroly, skupina 2 – IgAN, skupina 3 – jiné glomerulopatie (membranózní glomerulonefritida, ANCA asociovaná vaskulitida, lupusová nefritida, diabetická nefropatie)

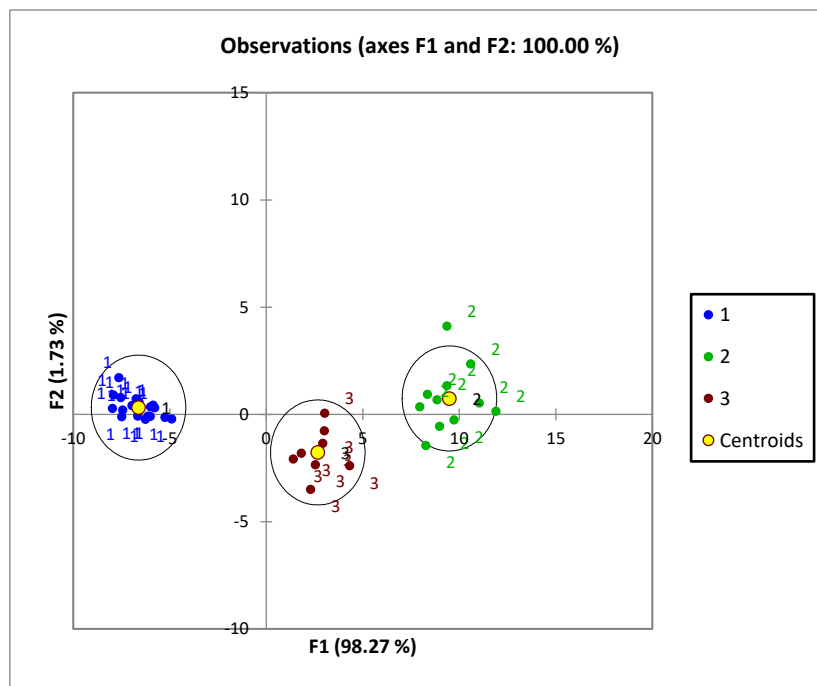
Pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) jsme hodnotili všechny proměnné v jednotlivých vyšetřovaných skupinách. Statistická analýza rozdělila markery do dvou různých skupin.

Markery z první skupiny byly schopné odlišit zdravé kontroly od pacientů s IgAN a/nebo od

skupiny nemocných s jiným typem glomerulopatie (nemocné kontroly), ale neumožňovaly odlišit nemocné s IgAN od nemocných kontrol. Diskriminační analýza identifikovala 3 metabolity (dodecanal, 8 -hydroxyguanosin, leukotrien C4), 3 proteiny (α 1-antitrypsin, IgA-uromodulin komplex, galaktóza-deficientní IgA1) a heparan sulfát (Tab. 18, Obr. 16), které byly schopné odlišit všechny tři sledované skupiny pacientů navzájem (zdravé kontroly od pacientů s IgAN i od nemocných s jiným typem glomerulopatie). Využití těchto markerů bylo ověřeno i po standardizaci výsledků ke koncentraci močového kreatininu (Tab. 19, Obr. 17).

Metabolomické markery
Dodecanal
8-Hydroxyguanosine
Leukotrien C ₄
Proteomické markery
α 1-Antitrypsin
IgA-Uromodulin
Gg-IgA1
Heparan sulfát

Tab. 18: Močové markery, které jsou schopny odlišit jednotlivé zkoumané skupiny: skupina 1(zdravé kontroly), skupina 2 (IgAN), skupina 3 (nemocné kontroly) (Obr. 16). Diskriminační analýza těchto markerů (viz Tab. 19 – plný seznam zkoumaných markerů) potvrdila přesnou distribuci v rámci tří sledovaných skupin.



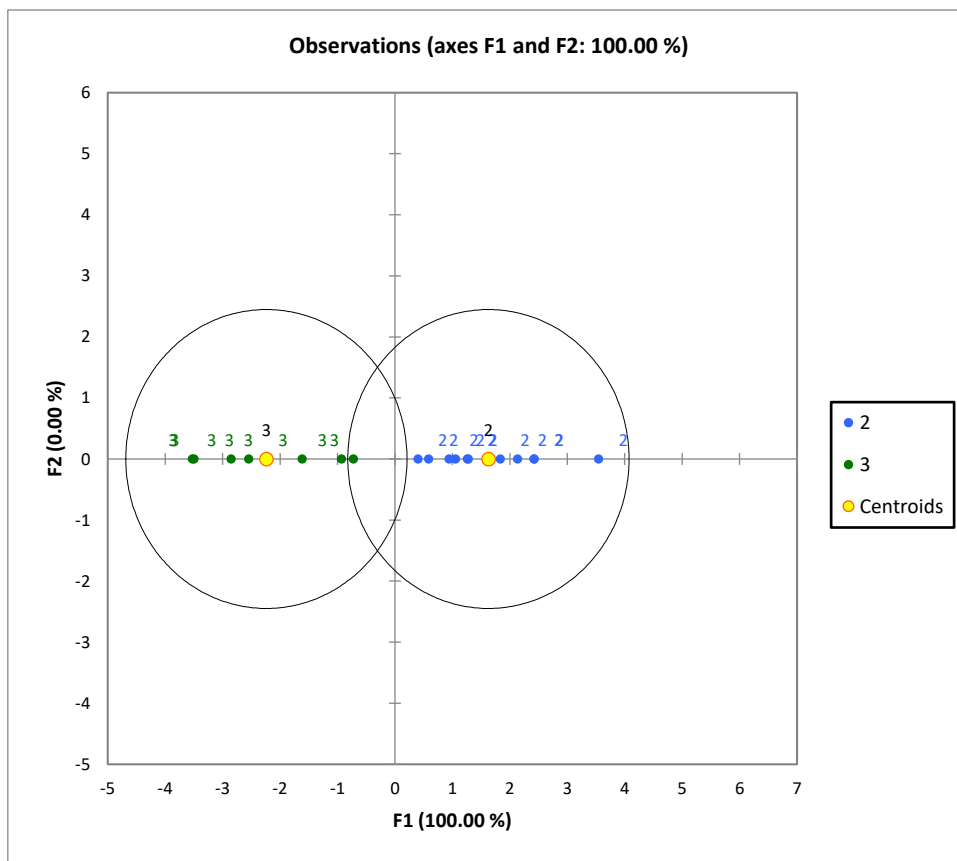
Obr. 16: Grafické znázornění výsledku diskriminační analýzy sedmi močových markerů. F1 a F2, arteficiální osy (snížení hlavních položek o 7 vybraných markerů ve dvou rozměrném prostoru), skupina 1 (zdravé kontroly, modře), skupina 2 (IgAN, zeleně), skupina 3 (nemocné kontroly, červenohnědě), žluté kružnice zobrazují centroidy pro každou skupinu, 95 % confidence interval elipsy je kolem centra pro každou skupinu.

Analyt	IgAN	Nemocné kontroly
Malondialdehyd (ng/mg)	6,3	6,2
4-Hydroxyhexenal (ng/mg)	5,9	5,5
4-Hydroxynonenal (ng/mg)	6,6	7,2
Hexanal (ng/mg)	5,5	4,6
Heptanal (ng/mg)	6,2	5,6
Oktanal (ng/mg)	3,0	2,6

Analyt	IgAN	Nemocné kontroly
Nonanal (ng/mg)	2,9	2,9
Decanal (ng/mg)	2,7	2,4
Undodecanal (ng/mg)	1,4	1,3
8-Hydroxyguanosin(pg/mg)	65,6	54,6
5-Hydroxymethyluracil (pg/mg)	32,6	30,2
o-Tyrosine (pg/mg)	18,1	16,0
3-Chlorotyrosin (pg/mg)	10,0	8,6
Leukotrien B ₄ (pg/mg)	75,8	56,1
8-Isoprostan (pg/mg)	8,4	7,4
Leukotrien E ₄ (pg/mg)	26,0	24,5
Leukotrien D ₄ (pg/mg)	12,4	12,3
Leukotrien C ₄ (pg/mg)	14,5	14,0
Proteomické markery		
Interleukin 6 (pg/mg)	22,4	16,0
Interleukin 8 (pg/mg)	20,1	11,5
MCP-1 (ng/mg)	1,1	0,9
EGF (ng/mg)	0,5	0,6
α 1-antitrypsin (ng/mg)	10,8	7,8

Analyt	IgAN	Nemocné kontroly
IgA-Uromodulin (ng/mg)	99,1	40,3
Galaktóza deficientní IgA1/ng(mg)	35,5	28,1
Solubilní transferin	7,8	7,1
LG3 fragment endorepellinu (ng/mg)	9,8	12,3
Tumstatin (pg/mg)	30,6	31,9
Endostatin (pg/mg)	36,4	35,7
Heparan sulfát (µg/mg)	0,4	0,2

Tab. 19: Průměrné hodnoty koncentrace měřených analytů standardizovaných k močovému kreatininu u pacientů s IgAN a u nemocných kontrol.



Obr. 17: Grafické znázornění výsledku diskriminační analýzy sedmi močových markerů uvedených v Tab. 18 normalizovaných k močovému kreatininu (viz Tab. 19) pro dvě skupiny pacientů s onemocněním ledvin. Pro normalizované markery byla zjištěna stejná diskriminační síla jako u běžných markerů. Skupina 2 (pacienti s IgAN, zeleně), skupina 3 (nemocné kontroly, červenohnědě).

12.4 Stanovení nových potenciálních markerů IgAN pomocí proteomické a metabolické analýzy

V naší studii jsme zkoumali bílkovinné složení moči ve skupině 20 pacientů s IgAN a odpovídajícího počtu vzorků zdravých kontrol. Použili jsme techniku kombinované IEF-LC-MS-MS/MS s relativní kvantifikací iTRAQ označených peptidů. Z důvodu eliminace velkého množství běhů LC-MS-MS/MS jsme použili metodu částečného poolování.

Dva nezávislé označené a separované experimenty vedly k celkovému počtu 30 LC-běhů, shromažďující 33 000 MS/MS spekter. Data z obou paralelně probíhajících experimentů byla

sloučena a zpracována jako jedna sada pomocí softwaru Protein Pilot. S vysokou mírou spolehlivosti jsme dokázali identifikovat 201 individuálních proteinů s pravděpodobností falešného nálezu pod 1 %. K analýze diferenciální exprese jsme zvažovali pouze proteiny, které se podařilo identifikovat alespoň dvěma peptidy a každý peptid byl určen s mírou jistoty alespoň 95 %. Kvantitativní výsledky obou proteomických experimentů byly statisticky analyzovány. Tato analýza odhalila 30 proteinů s významně odlišnou expresí v moči pacientů s IgAN ve srovnání se zdravými kontrolami ($p < 0,05$), 9 z nich mělo sníženou hladinu a 21 zvýšenou hladinu.

Označení bílkoviny	Název bílkoviny	Fold change iTRAQ-IEF-LC- MALDI-TOF/TOF	Změny hladin
ALBU_HUMAN	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	4,19*	Zvýšená
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens GN=SERPINA1 PE=1 SV=3	3,56*	Zvýšená
A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=4	3,50*	Zvýšená
IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2	2,76*	Zvýšená
TRFE_HUMAN	Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3	3,38*	Zvýšená
APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=1 SV=1	2,13*	Zvýšená
VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens GN=GC PE=1 SV=1	2,72*	Zvýšená
HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2	2,51*	Zvýšená
A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=ORM1 PE=1 SV=1	2,24*	Zvýšená
AFAM_HUMAN	Afamin OS=Homo sapiens GN=AFM PE=1 SV=1	2,06*	Zvýšená
IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2	2,41*	Zvýšená
HBA_HUMAN	Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2	2,26*	Zvýšená

Označení bílkoviny	Název bílkoviny	Fold change iTRAQ-IEF-LC- MALDI-TOF/TOF	Změny hladin
A1AG2_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 2 OS=Homo sapiens GN=ORM2 PE=1 SV=1	2,19*	Zvýšená
IGLL5_HUMAN	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5 OS=Homo sapiens GN=IGLL5 PE=4 SV=2	1,94*	Zvýšená
IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	1,87*	Zvýšená
CO3_HUMAN	Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2	1,79*	Zvýšená
CERU_HUMAN	Ceruloplasmin OS=Homo sapiens GN=CP PE=1 SV=1	1,76*	Zvýšená
HPT_HUMAN	Haptoglobin OS=Homo sapiens GN=HP PE=1 SV=1	1,75*	Zvýšená
IGHA2_HUMAN	Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3	1,69*	Zvýšená
C9JV77_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=AHSG PE=1 SV=1	1,66*	Zvýšená
PEPA3_HUMAN	Pepsin A-3 OS=Homo sapiens GN=PGA3 PE=1 SV=1	0,22*	Snížená
AMPN_HUMAN	Aminopeptidase N OS=Homo sapiens GN=ANPEP PE=1 SV=4	0,45*	Snížená
UROM_HUMAN	Uromodulin OS=Homo sapiens GN=UMOD PE=1 SV=1	0,74*	Snížená
ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 OS=Homo sapiens GN=ITIH4 PE=1 SV=4	0,27*	Snížená
MASP2_HUMAN	Mannan-binding lectin serine protease 2 OS=Homo sapiens GN=MASP2 PE=1 SV=4	0,51*	Snížená
KNG1_HUMAN	Kininogen-1 OS=Homo sapiens GN=KNG1 PE=1 SV=2	0,65*	Snížená
FINC_HUMAN	Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 PE=1 SV=4	0,64*	Snížená
CD44_HUMAN	CD44 antigen OS=Homo sapiens GN=CD44 PE=1 SV=3	0,55*	Snížená
EGF_HUMAN	Pro-epidermal growth factor OS=Homo sapiens GN=EGF PE=1 SV=2	0,46*	Snížená

Tab. 20: Diferenciální exprese proteinů v moči pacientů s IgAN proti zdravým kontrolám zjištěná metodou iTRAQ-IEF-LC-MALDI-TOF/TOF-MS (p <0,05). Hodnota P <0,05 byla

vypočtena pomocí softwaru Protein Pilot 5,0 založeného na dvojitéch t-testech, kde stupeň volnosti se rovná počtu rozdílných peptidů minus jeden.

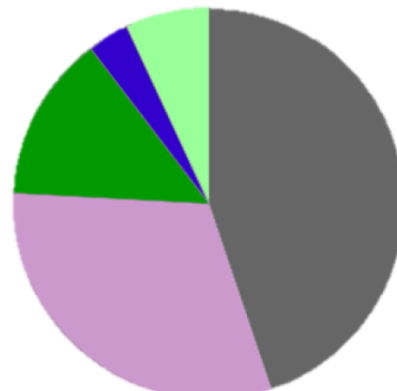
Klasifikační systém PANTHER byl použit k usnadnění analýzy proteinů a genů při testování s vysokou propustností. V rámci testování byly proteiny klasifikovány podle čeledi a podčeledi. Čeleď je definována jako skupina vývojově příbuzných proteinů, podčeledi tvoří příbuzné proteiny se stejnou funkcí. Funkce proteinu je dále specifikována jako molekulární funkce (tedy funkce proteinu samotného nebo s přímou interakcí s proteiny na biochemické úrovni, např. kináza), biologický proces (funkce proteinů v kontextu širší sítě bílkovin, které interagují za účelem dosažení procesu na úrovni buňky, nebo organismu, např. mitóza) anebo cesta proteinu (proces obdobný biologickému, který jednoznačně specifikuje vztahy mezi interagujícími molekulami). Většina námi identifikovaných proteinů se podílí na metabolických a biologických procesech nebo je součástí koagulační kaskády. Jedná se o enzymové proteiny, hydrolázy a transportní proteiny.

PANTHER GO-Slim Biological Process
Total Genes: 30 Total Process hits: 92



- biological adhesion
- biological regulation
- cellular component organization or biogenesis
- cellular process
- developmental process
- immune system process
- localization
- metabolic process
- multicellular organismal process
- response to stimulus

PANTHER GO-Slim Molecular Function
Total Genes: 30 Total Function hits: 29



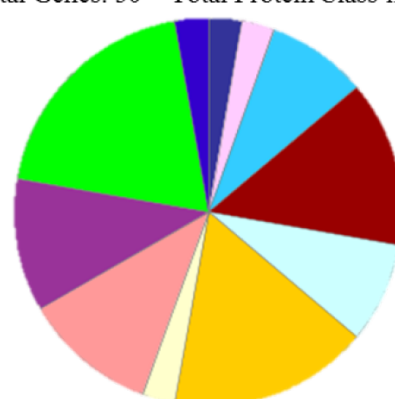
- binding
- catalytic activity
- receptor activity
- signal transducer activity
- transporter activity

PANTHER Pathway
Total Genes: 30 Total Pathway hits: 7



- Alzheimer disease-presenilin pathway
- Blood coagulation
- EGF receptor signaling pathway
- Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway
- Integrin signalling pathway
- Vitamin D metabolism and pathway

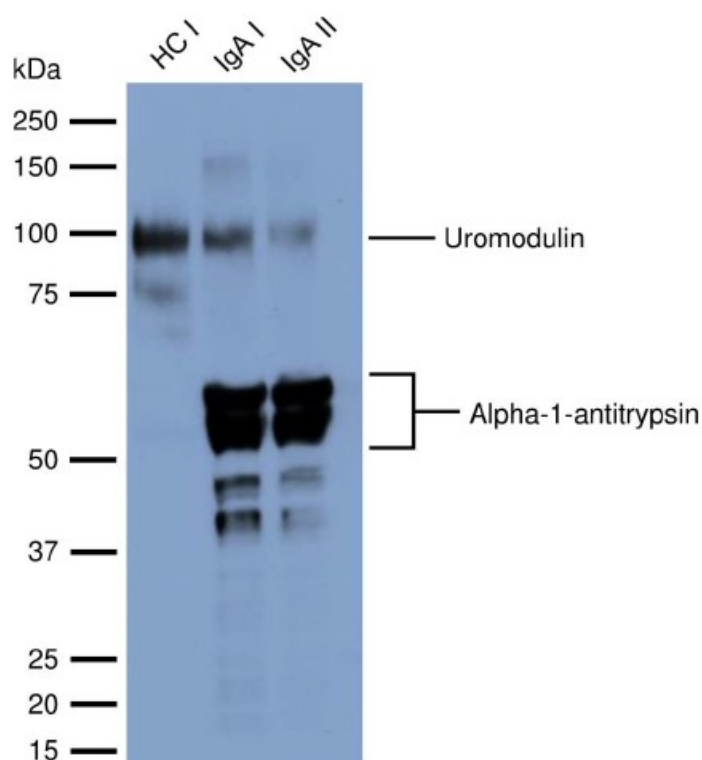
PANTHER Protein Class
Total Genes: 30 Total Protein Class hits: 36



- calcium-binding protein
- cell adhesion molecule
- defense/immunity protein
- enzyme modulator
- extracellular matrix protein
- hydrolase
- oxidoreductase
- receptor
- signaling molecule
- transfer/carrier protein
- transporter

Obr. 18: Klasifikační systém PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships)

Námi identifikovaných 30 proteinů se podílí zejména na funkci komplementu a v koagulaci, či jsou součástí regulace aktinového cytoskeletu. Tab. 20 uvádí souhrnně 30 proteinů, jejichž koncentrace se významně lišila v moči pacientů s IgAN proti zdravým kontrolám. Nejvýznamnější rozdíly byly patrné v hladinách alfa-1 antitrypsinu a serotransferinu, jejichž hodnoty byly vyšší až trojnásobně, oproti tomu hladina pepsinu byla nižší více jak sedmkrát proti zdravým kontrolám. Tyto údaje byly hodnoceny jako statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi množstvím bílkovin u pacientů s IgAN ve srovnání se zdravými kontrolami. Provedli jsme Western blottovou analýzu pro dva proteiny, které mají potenciální význam jako biomarkery IgAN – uromodulin a alfa-1 antitrypsin. Výsledek potvrdil snížení uromodulinu a zvýšení alfa-1 antitrypsinu identifikované proteomickými látkami (Obr. 19).



Obr. 19: Western blot potvrzení expresních změn lidského uromodulinu a lidského alfa-1 antitrypsinu ve sružených vzorcích močových proteinů. Deset mikrogramů celkového obsahu bílkovin bylo naloženo na jednu dráhu. Detekce uromodulinu je snížena a ve vzorcích pacientů IgAN (IgAI, IgAII) je v porovnání se zdravými kontrolami (HCI) zvýšený signál alfa-1

antitrypsinu. Linie označují uromodulinové a alfa-1 antitrypsinové specifické pásy a markery molekulové hmotnosti proteinu.

12.5 Zhodnocení intrarenálního barvení TLR u pacientů s IgAN

Hodnotili jsme vzorky biopsie ledvinné tkáně od 34 pacientů s IgAN, 7 pacientů s ANCA asociovanou vaskulitidou a 15 vzorků zdravé tkáně ledvin. Tento soubor jsme rozdělili do 6 skupin podle laboratorních nálezů v době biopsie a typu glomerulárního onemocnění. 1. skupinu tvořili nemocní s IgAN a s proteinurií < 1 g/24 hod a normální funkcí ledvin, 2. skupina byla složena z pacientů s IgAN a s proteinurií > 1 g/24 hod a normální renální funkcí, 3. skupinu tvořili pacienti s IgAN s proteinurií > 1 g/24 hod a sérovým kreatininem > 150 $\mu\text{mol/l}$, 4. skupina obsahovala nemocné s IgAN se sérovým kreatininem > 150 $\mu\text{mol/l}$ a proteinurií < 1 g/24 hod, 5. skupina byli nemocní s postižením ledvin při ANCA asociované vaskulitidě a 6. skupinu tvořily vzorky zdravé renální tkáně (Tab. 21, 22, 23, 24).

Skupina 1–4: IgAN	Počet pacientů
skupina 1: PU < 1 g/24 hod, normální funkce ledvin	8
skupina 2: PU > 1 g/24 hod, normální funkce ledvin	11
skupina 3: renální insuficience: S-kreat > 150 $\mu\text{mol/l}$, PU > 1 g/24 hod	10
skupina 4: renální insuficience: S-kreat > 150 $\mu\text{mol/l}$, PU < 1 g/24 hod	5
skupina 5: ANCA asociovaná vaskulitida	7
skupina 6: zdravé kontroly	15

Tab. 21: Rozdělení pacientů, jejichž vzorek ledvinné tkáně byl zkoumán dle typu glomerulopatie a laboratorních nálezů v době biopsie. Pacienti s IgAN dle klinických parametrů v době biopsie: 1. skupina normální funkce ledvin, PU < 1 g/24hod, 2. skupina normální funkce ledvin a PU > 1 g/24 hod, 3. skupina sérový kreatinin > 150 $\mu\text{mol/l}$ a PU > 1 g/24 hod, 4. skupina sérový kreatinin > 150 $\mu\text{mol/l}$, PU < 1 g/24 hod, 5 skupina pacienti s ANCA asociovanou vaskulitidou, 6. skupina – zdravé kontroly.

Parametr	S-kreat					PU					eGFR			
Skupina č.	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4
Počet pac.	8	11	10	5	7	8	11	10	5	7	8	11	10	5
Median	88	81	180	231	199	0,4	2,4	2,4	0,6	1,3	94	101	30	21
Průměr	87	79	220	311	216	0,5	3,0	4,1	0,6	1,9	86	101	31	20
SD	7	16	99	166	122	0,3	2,1	4,1	0,2	1,2	16	23	13	8

Tab. 22: Klinické parametry čtyř skupin pacientů s IgAN a ANCA asociovanou vaskulitidou v době biopsie. S-kreat – sérový kreatinin ($\mu\text{mol/l}$); PU - proteinurie ($\text{g}/24 \text{ h}$); eGFR (MDRD, $\text{ml}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$); Počet pac. - počet pacientů; skupina pacientů s IgAN: 1. skupina normální funkce ledvin, $\text{PU} < 1 \text{ g}/24\text{hod}$, 2. skupina normální funkce ledvin a $\text{PU} > 1 \text{ g}/24 \text{ hod}$, 3. skupina sérový kreatinin $> 150 \mu\text{mol/l}$ a $\text{PU} > 1 \text{ g}/24 \text{ hod}$, 4. skupina sérový kreatinin $> 150 \mu\text{mol/l}$, $\text{PU} < 1 \text{ g}/24 \text{ hod}$, 5. skupina pacienti s ANCA asociovanou vaskulitidou.

Skupina	S-kreat	PU	eGFR
1	94	0,2	79
2	83	0,62	91
3	294	1	17
4	456	2	11
5	193	0,3	38

Tab. 23: Klinické parametry na konci sledování. Rozdělení pacientů do 5 skupin. Pacienti s IgAN dle klinických parametrů v době biopsie: 1. skupina normální funkce ledvin, $\text{PU} < 1 \text{ g}/24\text{hod}$, 2. skupina normální funkce ledvin a $\text{PU} > 1 \text{ g}/24 \text{ hod}$, 3. skupina sérový kreatinin $> 150 \mu\text{mol/l}$ a $\text{PU} > 1 \text{ g}/24 \text{ hod}$, 4. skupina sérový kreatinin $> 150 \mu\text{mol/l}$, $\text{PU} < 1 \text{ g}/24 \text{ hod}$, 5 skupina pacienti s ANCA asociovanou vaskulitidou.

Parametr	P hodnota
S-kreat	$<0,0001$
PU	$<0,0001$
eGFR	$<0,0001$
ERYU	0,454

Tab. 24: výsledky Mood testu za použití klinických parametrů (kreatinin, proteinurie, eGFR dle MDRD v době biopsie). Rozdělení pacientů do 5 skupin. Pacienti s IgAN dle klinických parametrů v době biopsie: 1. skupina normální funkce ledvin, PU < 1 g /24hod, 2. skupina normální funkce ledvin a PU > 1 g/24 hod, 3. skupina sérový kreatinin > 150 μmol/l a PU > 1 g/24 hod, 4. skupina sérový kreatinin > 150 μmol/l, PU < 1 g/24 hod, 5 skupina pacienti s ANCA asociovanou vaskulitidou. Zkratky parametrů posuzovaných v době renální biopsie: S-kreat – sérový kreatinin (μmol/l), PU – proteinurie (g/24 hod), eGFR – glomerulární filtrace (MDRD, ml/min/1,73 m²), ERYU – erytrocytúrie (10⁶/l).

Po nabarvení vzorků tkáně ledvin protilátkami specifickými pro TLR4, 7, 8 a 9 jsme zjistili jasné zřetelné rozdíly ve všech skupinách. Skupiny se vzorky s IgAN vykazovaly rozdíly v barvení v rámci jednotlivých podskupin rozdělených podle výše proteinurie a hladiny sérového kreatininu. Vzorky pacientů s IgAN vykazovaly barvení v glomerulech pro TLR4, tubuly byly pozitivní pro barvení na TLR4, TLR7, TLR8. Barvení pro TLR 9 bylo jen málo výrazné, byly patrné rozdíly mezi jednotlivými skupinami. U nemocných se závažně poškozenou renální funkcí a proteinurií bylo zjevné jen mírné pozitivní zbarvení intersticia a glomerulů (Tab. 25, 26, 27, 28).

Mezangium	0	I	II	III	Celkem*
skupina-1	2	6			8
skupina-2	4	5	1	1	11
skupina-3	1	7	2		10
skupina-4		5			5
skupina-5		7			7
skupina-6	14	1			15

Podocyty/srpky	0	I	II	III	Celkem
skupina -1	6	2			8
skupina -2	7	4			11
skupina -3	3	3	4		10
skupina -4	1	3	1		5
skupina -5	1	1	2	3	7
skupina -6	15				15

Prox. Tubuly	0	I	II		Celkem
skupina -1	3	5			8
skupina -2	6	5			11
skupina -3	4	5	1		10
skupina -4	2	3			5
skupina -5	1	2	4		7
skupina -6	11	4			15

Dist. Tubuly	0	I	II	III	Celkem
skupina -1	2	1	5		8
skupina -2	3	4	1	3	11
skupina -3		1	6	3	10
skupina -4			1	4	5
skupina -5			2	5	7
skupina -6	10	4	1		15

* vyjádřeno jako počet pozitivních případů pro každou skupinu

Tab. 25: Intrarenální barvení pro TLR4. Stupně barvení: 0 – negativní barvení, I.- mírně pozitivní barvení (< 25 %), II. – středně pozitivní zbarvení (< 50 %), III.- silně pozitivní zbarvení (> 75 %), skupiny 1-4 – pacienti s IgAN – rozdělení dle klinických parametrů v době biopsie: 1. skupina normální funkce ledvin, PU < 1 g /24hod, 2. skupina normální funkce ledvin a PU > 1 g/24 hod, 3. skupina sérový kreatinin > 150 μmol/l a PU > 1g/24 hod, 4. skupina sérový kreatinin > 150 μmol/l, PU < 1g/24 hod, 5. skupina pacienti s ANCA asociovanou vaskulitidou, 6. skupina – zdravé kontroly.

Mezangium	0	I	II	III	Celkem*
skupina-1	3	5			8
skupina -2	7	4			11
skupina -3	10				10
skupina -4	4	1			5
skupina -5	3	4			7
skupina -6	8	7			15

Podocyty/srpky	0	I	II	III	Celkem
skupina -1	3	4	1		8
skupina -2	2	5	3	1	11
skupina -3	1	8	1		10
skupina -4		5			5
skupina -5	1	1	1	4	7
skupina -6	6	9			15

Prox. tubuly	0	I	II	III	Celkem
skupina -1	5	3			8
skupina -2	10	1			11
skupina -3	8	1	1		10
skupina -4	2	3			5
skupina -5	3	2	2		7
skupina -6	14	1			15

Dist. tubuly	0	I	II	III	Celkem
skupina -1	2	1	3	2	8
skupina -2	1	7	3		11
skupina -3	3	6	1		10
skupina -4	3	2			5
skupina -5		3	3	1	7
skupina-6	11	4			15

* vyjádřeno jako počet pozitivních případů pro každou skupinu

Tab. 26: Intrarenální barvení pro TLR7. Stupně barvení: 0 – negativní barvení, I.- mírně pozitivní barvení (< 25 %), II. – středně pozitivní zbarvení (< 50 %), III.- silně pozitivní zbarvení (> 75 %), skupiny 1-4 – pacienti s IgAN – rozdělení dle klinických parametrů v době biopsie: 1. skupina normální funkce ledvin, PU < 1 g /24hod, 2. skupina normální funkce ledvin a PU > 1 g/24 hod, 3. skupina sérový kreatinin > 150 μ mol/l a PU > 1g/24 hod, 4. skupina sérový kreatinin > 150 μ mol/l, PU < 1g/24 hod, 5. skupina pacienti s ANCA asociovanou vaskulitidou, 6. skupina – zdravé kontroly.

Mezangium	0	I	II	III	Celkem*
skupina-1	2	6			8
skupina -2	5	6			11
skupina -3	1	9			10
skupina -4	1	4			5
skupina -5	1	6			7
skupina -6	15				15

Podocyty/srpky	0	I	II	III	Celkem
skupina -1	4	4			8
skupina -2	8	3			11
skupina -3	5	5			10
skupina -4	3	2			5
skupina -5		2	2	3	7
skupina -6	15				15

Prox. Tubuly	0	I	II	III	Celkem
skupina -1			8		8
skupina -2		11			11
skupina -3		5	4	1	10
skupina -4			4	1	5
skupina -5		1	3	3	7
skupina -6	8	5	2		15

Dist. Tubuly	0	I	II	III	Celkem
skupina -1		3	5		8
skupina -2		11			11
skupina -3		1	6	3	10
skupina -4			4	1	5
skupina -5		1	3	3	7
skupina -6	9	5	1		15

* vyjádřeno jako počet pozitivních případů pro každou skupinu

Tab. 27: Intrarenální barvení pro TLR8. Stupně barvení: 0 – negativní barvení, I.- mírně pozitivní barvení (< 25 %), II. – středně pozitivní zbarvení (< 50 %), III.- silně pozitivní zbarvení (> 75 %), skupiny 1-4 – pacienti s IgAN – rozdělení dle klinických parametrů v době biopsie: 1. skupina normální funkce ledvin, PU < 1 g /24hod, 2. skupina normální funkce ledvin a PU > 1 g/24 hod, 3. skupina sérový kreatinin > 150 μ mol/l a PU > 1g/24 hod, 4. skupina sérový kreatinin > 150 μ mol/l, PU < 1g/24 hod, 5. skupina pacienti s ANCA asociovanou vaskulitidou, 6. skupina – zdravé kontroly.

Mezangium	0	I	II	III	Celkem*
Skupina-1	4	4			8
Skupina -2	11				11
Skupina -3	10				10
Skupina -4	15				5
Skupina -5	6	1			7
Skupina -6	15				15

Podocyty/srpky	0	I	II	III	Celkem
Skupina -1	5	3			8
Skupina -2	11				11
Skupina-3	10				10
Skupina -4	5				5
Skupina -5	2	3	2		7
Skupina -6	15				15

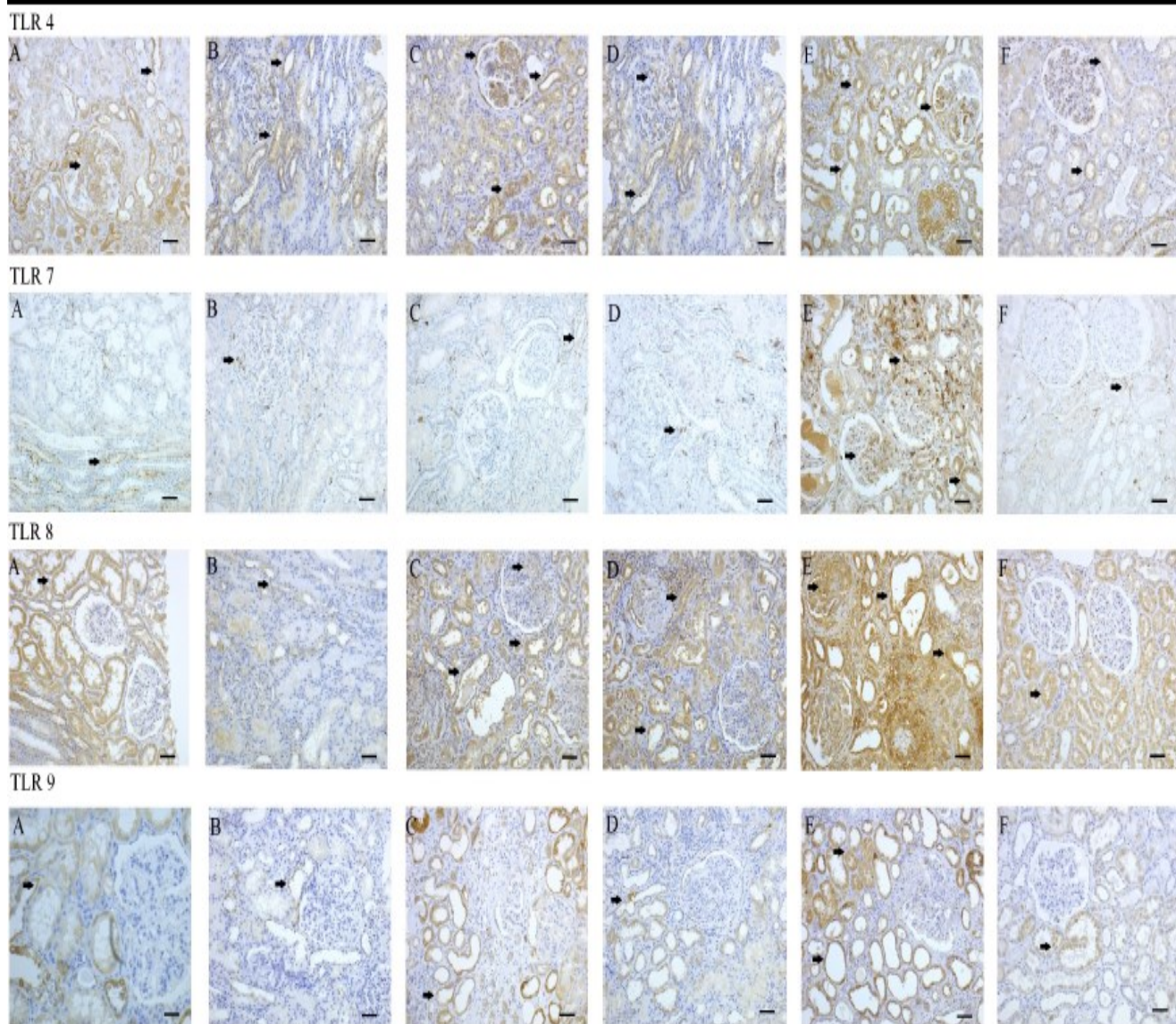
Prox. tubuly	0	I	II	III	Celkem
Skupina -1	1	6		1	8
Skupina -2	4	5	1	1	11
Skupina -3	4	6			10
Skupina -4		4	1		5
Skupina -5		1	3	3	7
Skupina -6	8	4	3		15

Dist. Tubuly	0	I	II	III	Celkem
Skupina-1			7	1	8
Skupina -2		2	9		11
Skupina -3			7	3	10
Skupina -4			2	3	5
Skupina -5			2	5	7
Skupina -6	2	5	8		15

* vyjádřeno jako počet pozitivních případů pro každou skupinu

Tab. 28: Intrarenální barvení pro TLR9. Stupně barvení: 0 – negativní barvení, I.- mírně pozitivní barvení (< 25 %), II. – středně pozitivní zbarvení (< 50 %), III.- silně pozitivní zbarvení (> 75 %), skupiny 1-4 – pacienti s IgAN – rozdělení dle klinických parametrů v době biopsie: 1. skupina normální funkce ledvin, PU < 1 g /24hod, 2. skupina normální funkce ledvin a PU > 1 g/24 hod, 3. skupina sérový kreatinin > 150 μmol/l a PU > 1g/24 hod, 4. skupina sérový kreatinin > 150 μmol/l, PU < 1g/24 hod, 5. skupina pacienti s ANCA asociovanou vaskulitidou, 6. skupina – zdravé kontroly.

Barvení pro TLR4 se ukázalo pozitivní v tubulech i glomerulech stejně tak jako v mezangiu a parietálních epiteliálních buňkách Bowmanových pouzder u pacientů s IgAN s kreatininem nad 150μmol/l (skupiny 3, 4) a u pacientů s ANCA asociovanou vaskulitidou. Nemocní s IgAN a s normální funkcí ledvin včetně zdravých kontrol (skupiny 1, 2, 6) vykazovali slabě pozitivní barvení pro TLR4 v oblasti distálních tubulů a glomerulů (Obr. 20). U pacientů s ANCA asociovanou vaskulitidou (skupina 5) bylo pozitivní difuzní barvení pro TLR7 v tubulech, intersticiu a glomerulech. Všechny ostatní vzorky včetně kontrol (tedy skupiny 1, 2, 3, 4, 6) měly jemně pozitivní buňky tubulů a glomerulů pro TLR7 (Obr. 20). Pacienti s normální funkcí ledvin (tedy skupiny 1, 2, 6) vykazovali jemně difuzní zbarvení tubulárních buněk pro TLR8. Pacienti s IgAN a sérovým kreatininem nad 150μmol/l a pacienti s ANCA asociovanou vaskulitidou (skupiny 3, 4, 5) měli difuzní pozitivní barvení tubulárního epitelu a intersticia pro TLR8. Tyto změny byly výraznější u pacientů s ANCA asociovanou vaskulitidou (skupina 5) (Obr. 20). Barvení pro TLR9 bylo patrné v bioptických vzorcích u jedinců s IgAN a s normální funkcí ledvin, včetně kontrol (skupiny 1, 2, 6), a mělo charakter jemného fokálního zbarvení epiteliálních buněk tubulů. Pacienti s IgAN s kreatininem $\geq 150\mu\text{mol/l}$ a proteinurií nad 1 g/24 hod i pacienti s ANCA asociovanou vaskulitidou (skupiny 3, 5) prokázali difuzně pozitivní barvení v tubulárních epiteliálních buňkách.



Obr. 20: Příklady imunohistochemického barvení pro TLR4, 7, 8 a 9 histologických vzorků biopsie ledvin pacientů s IgAN rozdělených do skupin - 1. skupina normální funkce ledvin, $PU < 1 \text{ g/24 hod}$, 2. skupina normální funkce ledvin a $PU > 1 \text{ g/24 hod}$, 3. skupina sérový kreatinin $> 150 \mu\text{mol/l}$ a $PU > 1 \text{ g/24 hod}$, 4. skupina sérový kreatinin $> 150 \mu\text{mol/l}$, $PU < 1 \text{ g/24 hod}$, 5 skupina pacienti s ANCA asoc. vaskulitidou, 6. skupina – zdravé kontroly.

Měřítka = $50 \mu\text{m}$.

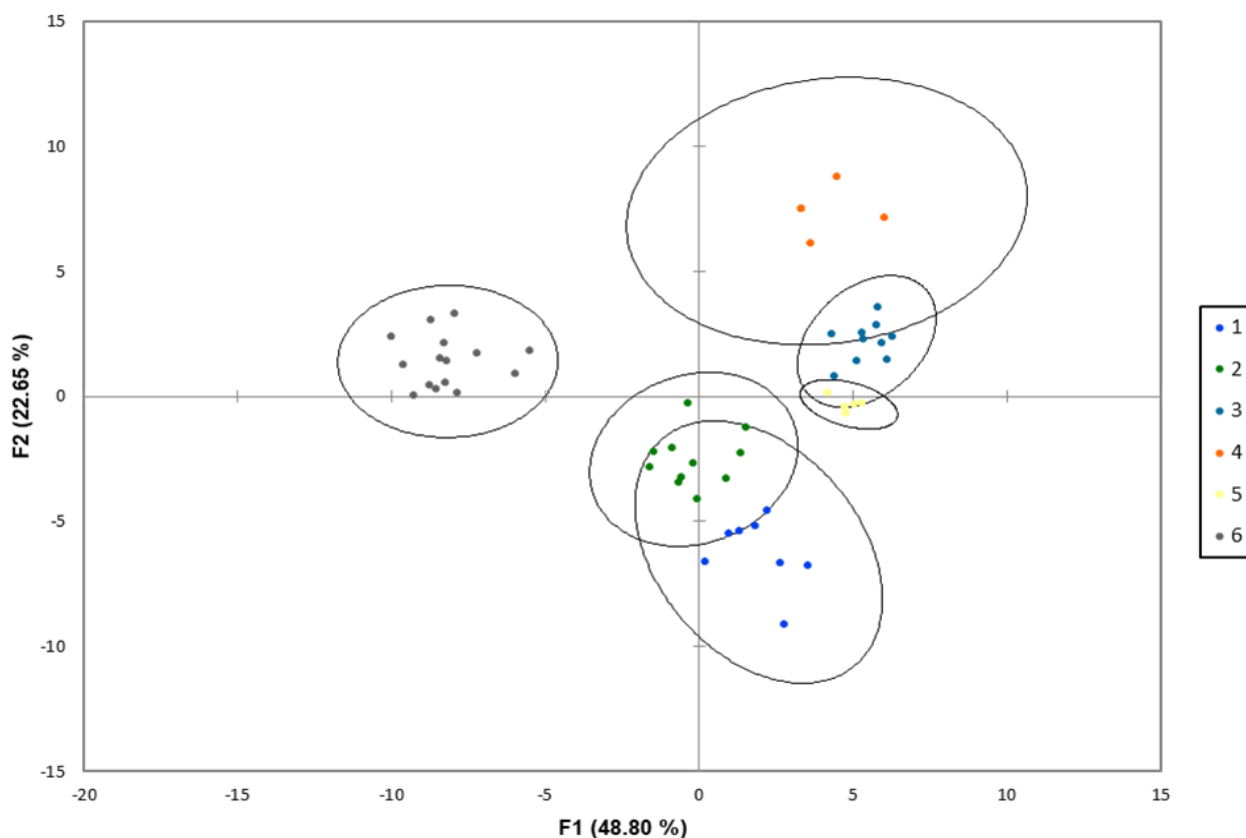
Imunohistochemická detekce TLR4 v ledvinné tkáni. A – pozitivní barvení v distálních tubulech a v glomerulech (šipka). B – slabě pozitivní barvení v distálních tubulech a několika proximálních tubulech. C, D a E-velmi podobné výsledky barvení s difúzní pozitivní detekcí v distálních a proximálních tubulech, stejně tak jako v glomerulech, včetně parietálních epiteliálních buněk Bowmanova pouzdra (šipka), F obdobně jako u B – slabě pozitivní zbarvení v distálních tubulech a glomerulech.

Imunohistochemická detekce TLR7 ve tkáni ledvin. A, B, C, D a F ukazuje velmi podobné výsledky s rozptýleným mírně pozitivním difuzní zbarvením buněk distálních tubulů a stejně tak detekci pozitivních buněk intersticia a glomerulů (šipka). Panel E vykazuje odlišné difuzní pozitivní barvení intersticiálních buněk a glomerulů (šipka).

Imunohistochemické barvení TLR8 v ledvinné tkáni. Panel A, B a F vykazuje podobné mírné difuzní zbarvení v epitelálních buňkách tubulů (šipka). Panel C, D, a E demonstruje difuzní pozitivní zbarvení v tubulárním epitelu a v intersticiu zejména u ANCA asociované vaskulitidy (šipka).

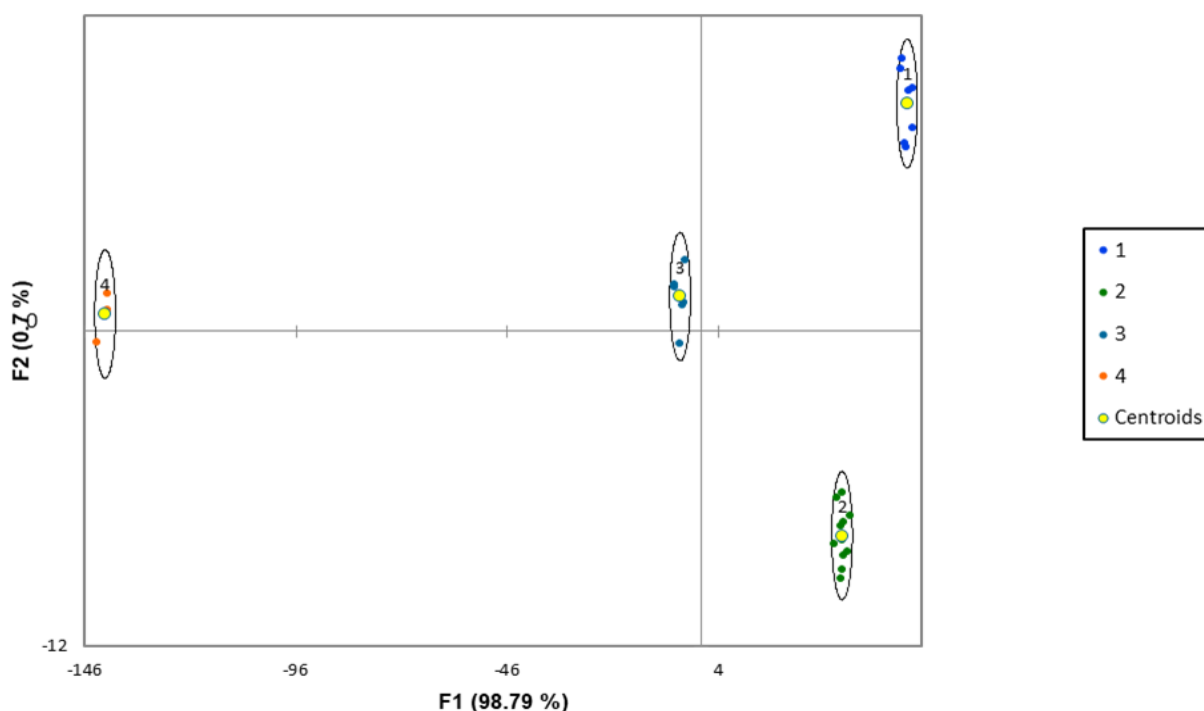
Imunohistochemická detekce TLR9 v ledvinné tkáni. Panel A, B vykazuje podobné mírné fokální barvení tubulárních buněk (šipka). Panel C a E demonstrují difuzní pozitivní detekci v tubulárních epiteliích (šipka).

Lineární diskriminační analýza prokázala intenzivnější barvení TLR4, 7, 8 a 9 u pacientů s IgAN ve srovnání se zdravými kontrolami (Obr. 21). Intrarenální barvení TLR4, 7, 8 a 9 dokáže rozlišit čtyři podskupiny pacientů s IgAN (Obr. 22).



Obr. 21: Lineární diskriminační analýza (LDA) ukázala, že intenzita barvení biopsických vzorků ledvinné tkáně pro TLR4, 7, 8 a 9 odlišila všechny diagnózy (čtyři skupiny IgAN,

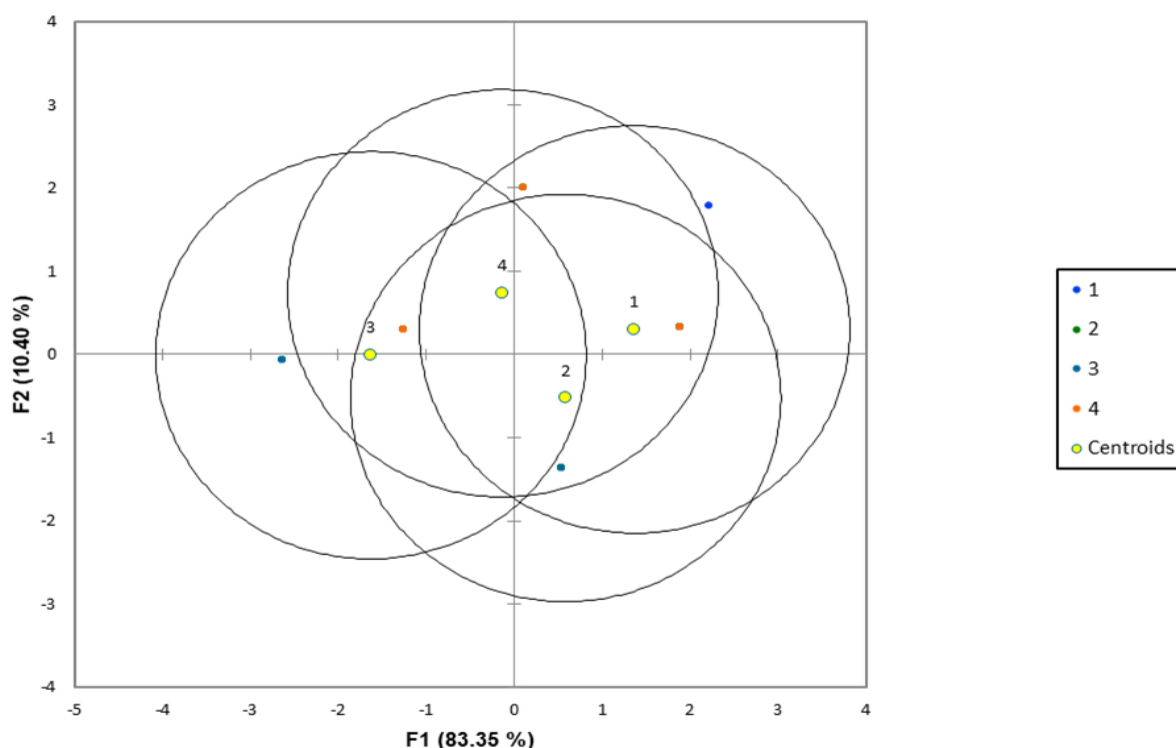
ANCA asociovanou vaskulitidu a zdravé kontroly). Přesnost rozlišení byla 100 % při použití matice záměn. Skupiny pacientů s IgAN - 1. skupina normální funkce ledvin, PU < 1 g /24hod, 2. skupina normální funkce ledvin a PU > 1 g/24 hod, 3. skupina sérový kreatinin > 150 μmol/l a PU > 1 g/24 hod, 4. skupina sérový kreatinin > 150 μmol/l, PU < 1 g/24 hod v době biopsie, 5 skupina pacienti s ANCA asociovanou vaskulitidou, 6. skupina – zdravé kontroly.



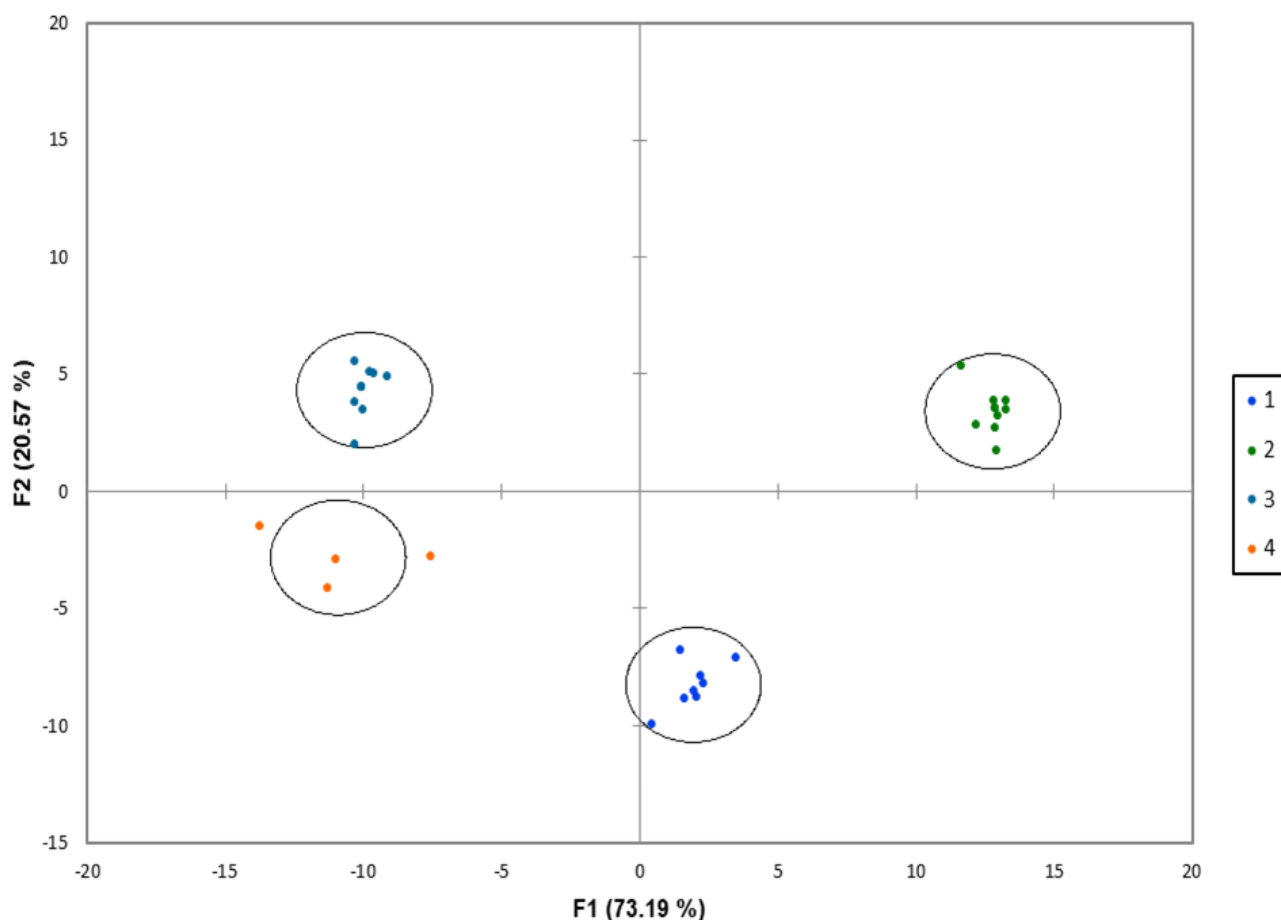
Obr. 22: Lineární diskriminační analýza potvrdila, že intenzita barvení pro TLR4, 7, 8 a 9 v bioptických vzorcích tkáně ledvin rozlišila čtyři skupiny pacientů s IgAN. Přesnost rozlišení byla 100 % při použití matice záměn. Skupiny pacientů - 1. skupina normální funkce ledvin, PU < 1 g /24hod, 2. skupina normální funkce ledvin a PU > 1 g/24 hod, 3. skupina sérový kreatinin > 150 μmol/l a PU > 1 g/24 hod, 4. skupina sérový kreatinin > 150 μmol/l, PU < 1 g/24 hod v době biopsie, 5 skupina pacienti s ANCA asociovanou vaskulitidou, 6. skupina – zdravé kontroly.

Hodnotili jsme korelaci mezi MEST skóre a klinickými údaji získanými od pacientů v době biopsie ledvin (proteinurie a eGFR). Lineární diskriminační analýza s Oxfordskou histologickou klasifikací rozlišila podskupiny pacientů s IgAN s přesností 65,6 % (Obr. 23). Po doplnění informace o intenzitě intrarenálního barvení pro TLR7, 8 a 9 v korelaci s Oxfordskou

klasifikací se zvýšila přesnost rozlišení čtyř podskupin pacientů s IgAN na 100 % při zhodnocení dle confusion matrix (Obr. 24). Navíc i samotné intrarenální barvení TLR odlišilo s přesností 100 % čtyři podskupiny pacientů s IgAN a různou úrovní renální funkce a proteinurie.



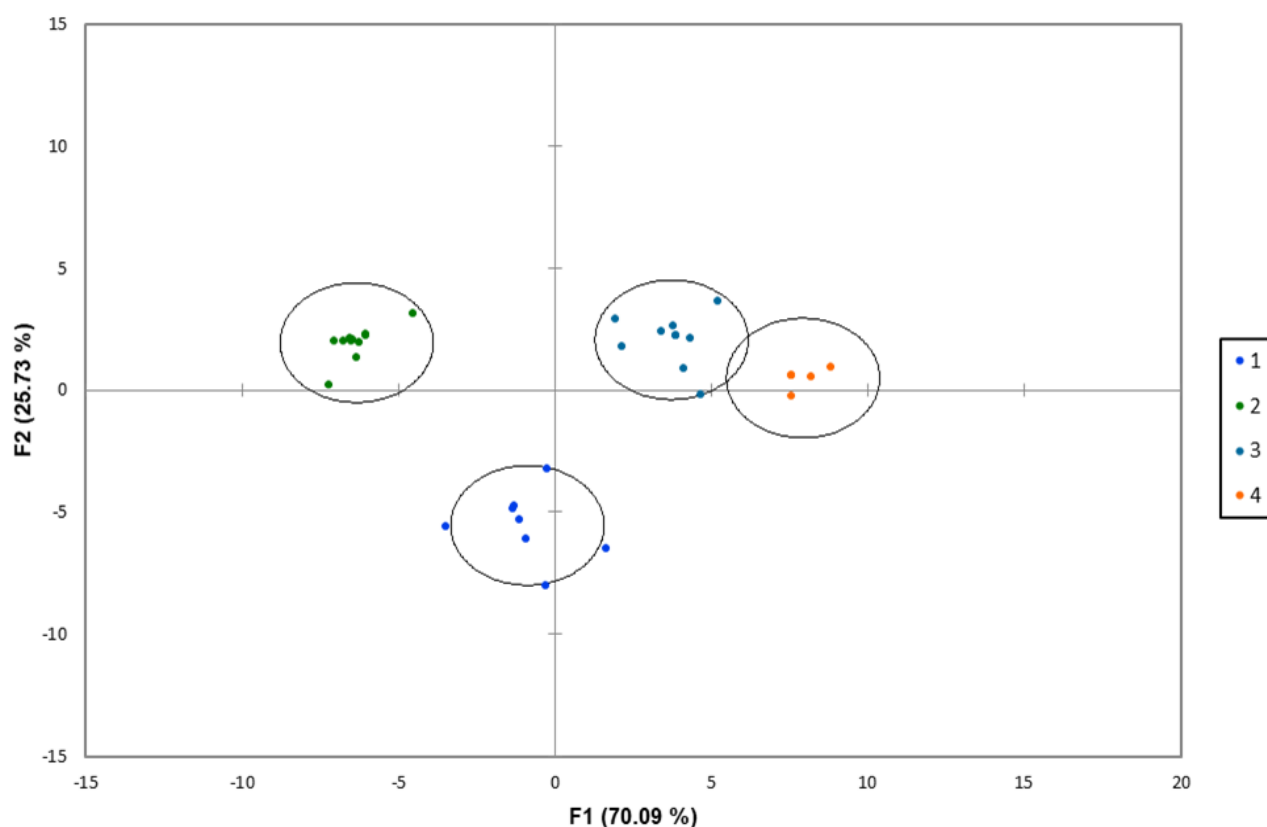
Obr. 23: Lineární diskriminační analýza (LDA) s použitím Oxfordské histologické klasifikace (MEST) ukázala rozložení podskupin IgAN s přesností rozlišení pouze 65,6 % při použití matice záměn. Skupiny pacientů s IgAN - 1. skupina normální funkce ledvin, PU < 1 g /24hod, 2. skupina normální funkce ledvin a PU > 1 g/24 hod, 3. skupina sérový kreatinin > 150μmol/l a PU > 1 g/24 hod, 4. skupina sérový kreatinin > 150μmol/l, PU < 1 g/24 hod v době biopsie.



Obr. 24: Použití kombinace intrarenálního barvení pro TLR7, 8 a 9 a Oxfordské histologické klasifikace (MEST) rozlišilo 100 % podskupiny pacientů s IgAN. Skupiny pacientů s IgAN - 1. skupina normální funkce ledvin, PU < 1 g /24hod, 2. skupina normální funkce ledvin a PU > 1 g/24 hod, 3. skupina sérový kreatinin > 150 μ mol/l a PU > 1 g/24 hod, 4. skupina sérový kreatinin > 150 μ mol/l, PU < 1 g/24 hod v době biopsie.

Následně jsme hodnotili vliv intrarenálního TLR barvení na rozlišení pacientů dle závažnosti onemocnění bez použití MEST skóre. Lineární diskriminační analýza ukázala, že intrarenální barvení TLR7, 8 a 9 rozlišilo čtyři podskupiny IgAN s přesností 100 % při použití matice záměn (Obr. 25). Obdobně kombinace intrarenálního barvení TLR8 a 9 nebo samotné TLR8 dokázalo rozlišit podskupiny IgAN s přesností 97 % a 94 %. Prokázali jsme zvýšené intrarenální barvení

pro TLR4 u pacientů s IgAN s proteinurií nad 1 g/24 hod a normální funkcí ledvin nebo u pacientů s IgAN a renální insuficiencí (Tab. 25).



Obr. 25: Lineární diskriminační analýza zjistila, že intrarenální barvení TLR7, 8 a 9 bez použití Oxfordské klasifikace MEST rozlišilo čtyři podskupiny nemocných s IgAN s přesností 100 % dle matice záměn. Skupiny pacientů s IgAN - 1. skupina normální funkce ledvin, PU < 1 g /24hod, 2. skupina normální funkce ledvin a PU > 1 g/24 hod, 3. skupina sérový kreatinin > 150 μ mol/l a PU > 1 g/24 hod, 4. skupina sérový kreatinin > 150 μ mol/l, PU < 1 g/24 hod v době biopsie.

Zvýšená intenzita barvení TLR9 byla potvrzena u pacientů s IgAN s normální funkcí ledvin a bez proteinurie (Tab. 28). V naší studii jsme prokázali zvýšené intrarenální barvení TLR4, 7, 8 a 9 u pacientů s IgAN oproti zdravým kontrolám. Intrarenální barvení TLR umožní rovněž rozlišovat různé podskupiny IgAN s odlišnou úrovní proteinurie i funkce ledvin.

13 Diskuze a závěr:

13.1 Známé klinické a laboratorní faktory ovlivňující prognózu českých pacientů s IgAN

V naší studii jsme hodnotili doposud největší kohortu pacientů s IgAN v České republice, zahrnující 520 pacientů, s průměrnou dobou sledování 6 let. Snažili jsme se posoudit a porovnat vliv nejdůležitějších rizikových faktorů na dlouhodobou prognózu onemocnění. Potvrdili jsme známé rizikové faktory pro progresi onemocnění jako je proteinurie, snížená eGFR a hypertenze v době diagnózy (16, 19, 93, 94, 95, 96, 97). Průměrné renální přežívání našich pacientů bylo 77,1 %, což je hodnota srovnatelná s dosud publikovanými výsledky (77,8 % (94), 79,8 % (96), 84 % (99), 85 % (98)). Geografická variabilita výsledků dlouhodobého renálního přežívání pacientů s IgAN byla již popsána v Helsinkách (93,3 %), v Torontu (61,4 %) (94). Geografická variabilita může být ovlivněna genetickými faktory (4), vlivy životního prostředí, stravovacími návyky a lokálně odlišnými medicínskými přístupy při screeningu a léčbě onemocnění (4).

V naší studii jsme potvrdili průměrný pokles eGFR dle CrCl u pacientů s IgAN -1 ml/min/1,73m²/rok, což je srovnatelná hodnota s finskými pacienty v Helsinkách s průměrným poklesem eGFR dle CrCl – 1,24ml/min/1,73m²/rok (94) oproti výrazně nepříznivějším výsledkům průměrného poklesu eGFR dle CrCl v jiných zemích (například – 2,95 ml/min/1,73m²/rok u pacientů v Sydney, -3,46ml/min/1,73m²/rok v Glasgow a – 3,99 ml/min/1,73m²/rok v Torontu) (94). Pacienti z Helsinek a Sydney měli však mírnější formu onemocnění se zachovalou funkcí ledvin (CrCl >75 ml/min) a nižší proteinurií (0,5 g/24hod) ve srovnání s nemocnými z Toronta a Glasgow. Soubor finských pacientů byl převážně tvořen z rozsáhlých screeningových programů vedených pro potřeby armády, udělování řidičských průkazů a zaměstnaneckých prohlídek. Dalším významným faktorem byl regionálně odlišný přístup k provedení biopsie ledvin u nemocných se suspektní glomerulopatií. V Torontu a

v Glasgow byli indikováni k biopsii ledvin pacienti s těžkou proteinurií ($> 1 \text{ g/24hod}$) nebo se známkami renálního selhávání, zatímco ve Finsku a v Sydney byly provedeny renální biopsie u pacientů s nižší proteinurií i bez poruchy renální funkce (94). Počet renálních biopsií v ČR se od roku 1994 významně navýšil, v r. 1994 bylo provedeno 44,1 biopsií/ milion obyvatel/rok, v roce 2001 58,2 biopsií/milion obyvatel/rok (99). K výpočtu průměrného poklesu CrCl jsme použili vstupní a konečnou hodnotu CrCl, zatímco Geddesova studie používá minimálně 3 střední hodnoty CrCl v průběhu sledování (94).

V souboru českých pacientů s IgAN zpracovávaných v této studii jsme zaznamenali odlišné deseti-leté renální přežívání mezi nemocnými ze VFN v Praze (64,6 %) a nemocnými z ostatních nefrologických center v ČR (88,3 %), což mohlo být ovlivněno odlišnostmi ve věkovém složení souboru ($P < 0,01$) a eGFR ($P < 0,01$) mezi pražským centrem a ostatními nefrologickými centry v ČR. Neshledali jsme významný rozdíl v distribuci pohlaví, proteinurie a hypertenze. Zaznamenali jsme však výrazněji vyšší počet starších nemocných nad 50 let ve skupině pacientů léčených a sledovaných ve VFN ($P < 0,01$). V tomto centru bylo sledováno i významně vyšší množství pacientů s progresivní renální insuficiencí (55 % pacientů s CrCl $< 0,99 \text{ ml/s}$, 17 % s CrCl $> 1,5 \text{ ml/s}$) s významnými rozdíly v průměrné CrCl: 0,99 ml/s u pacientů nad 50 let ve srovnání se střední hodnotou CrCl 1,36 ml/s u pacientů mladších 50 let. Zjistili jsme vyšší počet pacientů z pražského centra (130) ve skupině s CrCl $< 0,99 \text{ ml/s}$ ve srovnání s pacienty z ostatních nefrologických center České republiky (49). Průměrná CrCl ve skupině pacientů z centra VFN byla 0,58 ml/s, zatímco v ostatních centrech v ČR byla u pacientů průměrná hodnota CrCl 0,70 ml/s ($P < 0,01$). Rozložení hypertenze a proteinurie nebylo ve skupině pacientů s CrCl $< 0,99 \text{ ml/s}$ odlišné. Rozdíly v renálním přežívání pacientů byly pravděpodobně způsobeny nižší funkcí ledvin a vyšším věkem v centru VFN, kde jsou sledováni nemocní s významnějšími rizikovými faktory a závažnějšími laboratorními i

klinickými nálezy, což je pravděpodobně i příčinou rychlejší progresy renální funkce a méně příznivých výsledků renálního přežívání nemocných v tomto centru.

V naší studii bylo z celkového počtu 520 pacientů 215 nemocných (41,3 %) léčeno imunosupresivou. Data o imunosupresivní léčbě byla bohužel k dispozici pouze u 192 nemocných léčených v centru VFN, jedná se celkem o 192 pacientů. Kortikosteroidy bylo léčeno 112 nemocných (58,3 %), z toho 34 pacientů bylo léčeno monoterapií kortikosteroidy a 85 pacientů užívalo duální imunosupresi. 69 nemocných bylo léčeno cyklofosfamidem (35,9 %), 11 pacientů užívalo azathioprin (5,7 %), 5 pacientů bylo léčeno cyklosporinem (2,6 %). V naší práci jsme nehodnotili vliv imunosuprese na prognózu nemocných.

Nezjistili jsme vliv pohlaví na renální přežívání pacientů naší kohorty, poměr mužů a žen byl 2,2. Jiné práce potvrdily poměr mužů a žen 4,6 u pacientů v Glasgow (94), což bylo významně více ve srovnání s jinými centry (Toronto 1,8, Helsinky 1,7, Sydney 1,5) (94). Naproti tomu v Japonsku a dalších asijských zemích ženy převládají nad muži, což poukazuje na možné propojení genetických a etnických faktorů na distribuci IgAN (16, 96, 97, 100, 101, 102, 103). Pomocí Coxova regresního modelu proporcionálních rizik jsme hodnotili vliv věku na renální přežívání, vliv tohoto faktoru jsme však nepotvrdili. Deseti-leté přežívání u pacientů mladších 50 let bylo 78 %, zatímco nemocní starší 50 let měli renální přežívání 74 %, nicméně tento výsledek nebyl statisticky významný ($P = 0,514$). Podobně nebyla zjištěna ani závislost delta eGFR (konečná eGFR minus eGFR na počátku sledování) na věku. Jiné studie naopak potvrdily protektivní vliv vyššího věku na pokles CrCl a riziko rozvoje ESRD (94, 104).

V naší studii jsme zhodnotili dlouhodobé renální přežívání a rizikové faktory spojené s prognózou českých pacientů s IgAN. Celkové deseti-leté renální přežívání v naší kohortě pacientů bylo 77,1 %. Arteriální hypertenze, proteinurie nad 1 g/24 hod a nižší eGFR v době diagnózy byly nezávislé rizikové faktory ovlivňující renální přežívání českých pacientů s IgAN.

13.2 Zhodnocení vztahu Gd-IgA1 a anti-Gd-IgA1 k aktivitě onemocnění, vývoji renální funkce a prognózy u českých pacientů s IgAN

V této studii jsme hodnotili soubor 91 pacientů s IgAN. Soubor pacientů byl rozdělen na 3 skupiny podle hodnoty funkce ledvin na konci sledování nebo její změny v průběhu sledování (progresoři - pokles eGFR ≥ 50 % od výchozí hodnoty a konečná eGFR ≥ 15 ml/min/1,73m², n = 7, neprogresoři - stabilní funkce ledvin, n = 70, ESRD -pacienti, kteří dosáhli konečného selhání ledvin, eGFR ≤ 15 ml/min/1,73m, nebo zahájili léčbu nahrazující funkce ledvin, n = 14). Ve vzorcích séra od pacientů s IgAN v době biopsie ledvin jsme pomocí ELISA a lecitin-ELISA metody měřili celkové IgA, Gd-IgA1 a výpočtem stanovili eGFR dle MDRD. Provedením diskriminační analýzy v souboru 91 pacientů s IgAN za použití 5 sérových biomarkerů [IgA (mg/ml), Gd-IgA1 (U/l μ g IgA bez neuroaminidázy), Gd-IgA1 (U/ml bez neuraminidázy), Gd-IgA1 (U/l μ g IgA s neuraminidázou), Gd-IgA1 (U/ml, s neuraminidázou) a sérová protilátka specifická pro Gd-IdA1 (U/ml)] a hodnoty eGFR jsme zjistili, že skupinu ESRD je možné od ostatních 2 skupin odlišit zvýšenou hladinou Gd-IgA1 bez ošetření neuraminidázou. Toto zjištění umožnilo odlišit pacienty ohrožené těžkou progresí funkce ledvin nebo jejím selháním.

Dále jsme se zaměřili na nemocné s významným rizikem progresu onemocnění. Změřili jsme sérové hladiny Gd-IgA1 (po ošetření neuraminidázou i bez ošetření) ve skupině pacientů se stabilní funkcí ledvin (neprogresoři) a ve skupině nemocných s progredující formou choroby (progresoři). Na základě zvýšených hodnot hladiny Gd-IgA1 v obou měřeních (bez ošetření neuraminidázou i po jejím ošetření) jsme byli schopni odlišit pacienty s progredující formou choroby (progresoři) od nemocných se stabilní funkcí ledvin (neprogresoři). Poté jsme ve skupině 77 pacientů (progresorů a neprogresorů, po vyloučení pacientů ESRD) porovnali

biochemické i klinické parametry s histologickými nálezy dle klasifikace MEST a potvrdili jsme signifikantní vliv histologického parametru E, sérové hladiny IgA, Gd-IgA1 (U/ml, bez neuraminidázy) a eGFR.

Kompozitní skóre (M+E+S+T) bylo asociováno s hladinou sérové IgA a Gd-IgA1 (bez ošetření neuraminidázou) a eGFR. ROC křivka potvrdila využití těchto parametrů pro rozlišení skupiny progresorů a neprogresorů (P value vybraných proměnných: eGFR 0,028, hladina sérového IgA 0,014, sérová hladina Gd-IgA1 (U/ml), bez ošetření neuraminidázou 0,004, sérová hladina Gd-IgA (U/ml) s ošetřením neuraminidázou 0,047.

Ve studii jsem dále zkoumali, zda sérové hladiny IgA a Gd-IgA1 mohou být charakteristické pro pacienty se stabilní renální funkcí (neprogresoři) ve srovnání se skupinou pacientů s progredující renální funkcí (progresoři). Ani jeden z uvedených markerů však nebyl schopen tyto skupiny rozlišit, ale překvapivě jsme zjistili rozdíly mezi úrovní hladiny sérové IgG protilátky specifické proti Gd-IgA1 u obou skupin. Pomocí tohoto markeru můžeme jednoznačně odlišit uvedené dvě skupiny pacientů (progresoři versus neprogresoři).

Dále jsme stanovili nový predikční model progresu renální funkce u pacientů s IgAN s využitím pouze jednoho klinického parametru v době renální biopsie (eGFR) a jednoho sérového biomarkeru (sérové IgG specifické protilátky proti Gd-IgA1; IgG antiGd-IgA1). Prokázali jsme, že při použití klinického parametru eGFR v kombinaci se sérovým biomarkerem (IgG anti Gd-IgA1) lze již v době renální biopsie při diagnóze základního onemocnění predikovat riziko progresu u pacientů s IgAN. Nízká hladina sérové IgG anti-Gd-IgA1 identifikovala pacienty, kteří během sledování udrželi stabilní renální funkci s nízkým rizikem progresu onemocnění IgAN. Tyto závěry musí být nepochybně potvrzeny na větších souborech pacientů. V případě potvrzení našich výsledků bude možné za použití jednoho parametru renální funkce (eGFR) a jednoho sérového biomarkeru (IgG anti-Gd-IgA1) identifikovat pacienty s IgAN a

významným rizikem progresu choroby již v době diagnózy onemocnění s následným nasazením účinné terapie.

13.3 Výzkum některých močových markerů a stanovení potenciálních specifických biomarkerů pro pacienty s IgAN

Jedním z cílů našeho pilotního projektu bylo navrhnout nový přístup k neinvazivnímu testování za použití vyhodnocení bloku močových biomarkerů, který umožňuje využít synergický efekt kombinace jednotlivých markerů.

V naší pilotní studii jsme detekovali panel sedmi biomarkerů (dodecanal, 8-hydroxyguanosin, leukotrien C4, alfa1-antitrypsin, IgA-uromodulinový komplex, Gd-IgA1 a heparan sulfát), pomocí kterých jsme dokázali identifikovat nemocné s IgAN od pacientů s jiným typem onemocnění ledvin. Samostatně nebyl žádný z těchto biomarkerů pro IgAN specifický.

U pacientů s IgAN byly zjištěny zvýšené sérové hladiny Gd-IgA1 (25, 105), které byly spojeny i s progresí renální funkce a horší prognózou (26).

Uromodulin je tvořen v tlustém raménku Henleovy kličky a jedná se o nejčastěji zastoupenou bílkovinu v moči zdravého člověka (74). U pacientů s IgAN bylo zachyceno zvýšené množství fragmentů uromodulinu v moči proti zdravým kontrolám nebo ve srovnání s pacienty s jinou glomerulopatií (32). Rovněž komplex uromodulinu a IgA byl popsán jako možný diagnostický marker časně fáze onemocnění IgAN (74). 8-hydroxyguanosin je marker oxidace nukleových kyselin a dodecanal je marker peroxidace lipidů. Ve studii byly popsány známky změn rovnováhy poměru oxidačních a antioxidačních procesů v séru a erytrocytech u pacientů s IgAN (106). Podobně byla potvrzena i zvýšená hladina Gd-IgA1 a známky zvýšeného oxidativního stresu s možným ovlivněním nefrotoxicity Gd-IgA1 u pacientů s IgAN (107).

Leukotrieny jsou pro prozánětlivě působící látky, které patří do skupiny eikosanoidů a podílí se na chemotaxi neutrofilů. Byl popsán vliv leukotrienů v zánětlivé komponentě rozvoje IgAN (129). Další práce poukazují na aktivaci alternativní dráhy komplementu cestou properdinu působením tubulárního heparansulfátu, který může hrát roli v poškození ledvin spojeném s proteinurií (108). U primárních onemocnění glomerulů, spojených s proteinurií (membranózní nefropatie, IgAN, lupusová nefritida, MCD) byla prokázána zvýšená vazba heparan-sulfátového proteoglykanu na I-selektin a MCP-1 na tubulární buňky. Tubulointersticiální postižení se změnou tubulointersticiálního heparan-sulfátového proteoglykanu může souviset se zánětlivou odpovědí a progresí onemocnění (109).

Ve studii s 98 dětskými pacienty s mezangioproliferativní glomerulonefritidou (se 40 pacienty s IgAN, 37 pacienty s IgM nefropatií a 21 pacienty s mezangioproliferativní GN bez depozit IgA nebo IgM) byly potvrzeny zvýšené hladiny močového transferinu, zejména u pacientů se zvýšenou mezangiální celularitou, vyšším stupněm glomerulosklerózy a výraznějším tubulointersticiálním poškozením (110). Oproti těmto výsledkům v naší práci hladiny transferinu v moči u pacientů s IgAN byly nízké.

Další studie zaznamenala zvýšené hladiny α 1-antitrypsinu v moči u nemocných s IgAN (111), což v naší práci potvrzeno nebylo. Naše výsledky nepotvrdily ani závěry jiných studií, kde byly zvažovány hladiny epidermálního růstového faktoru, IL-6 a MCP-1 v moči za možný prediktor vývoje funkce ledvin (112).

V našem pilotním projektu se podařilo vytvořit panel sedmi markerů, které identifikují pacienty s IgAN oproti pacientům s jiným glomerulárním onemocněním a zdravým kontrolám. V současné době probíhá ověření těchto markerů ve větší kohortě pacientů a současně ověřujeme i korelaci markerů s klinickými parametry (proteinurie, erytrocyturie, renální funkce a dalšími) s cílem využití markerů i pro stanovení aktivity základního onemocnění.

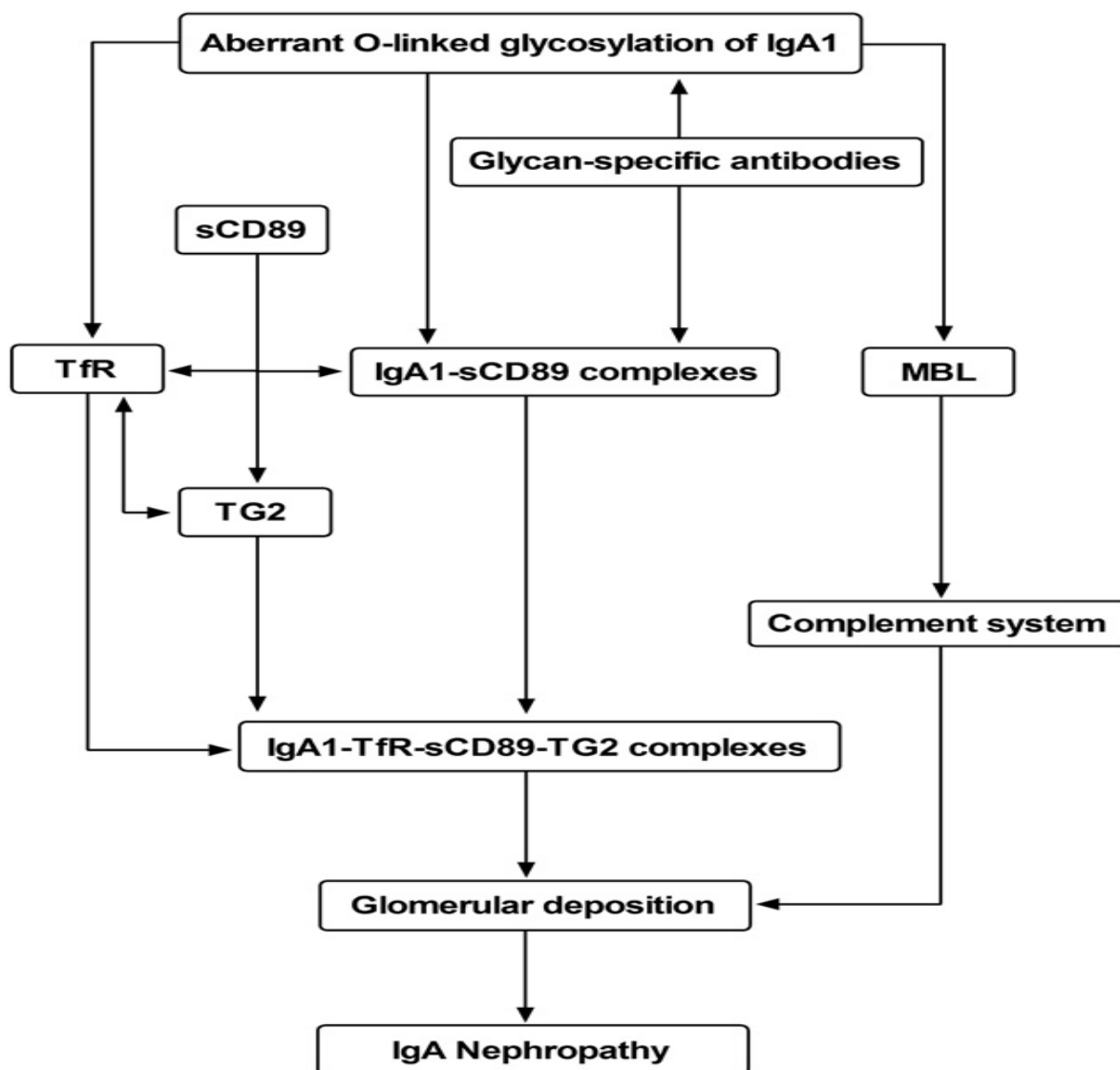
13.4 Stanovení nových potenciálních markerů IgAN s využitím proteomické a metabolické analýzy

V této studii jsme si kladli za cíl zhodnocení močového proteomu pacientů s IgAN. Prokázali jsme odlišnost ve složení močového proteomu u pacientů s IgAN ve srovnání se zdravými kontrolami. Potvrdili jsme 30 proteinů s výrazně odlišnou expresí ve vzorcích moči u pacientů s IgAN proti zdravým kontrolám, 9 proteinů vykazovalo sníženou hladinu a 21 proteinů mělo hladinu zvýšenou ve srovnání se vzorky moči od zdravých pacientů.

Nedávno identifikované biomarkery jsou v literatuře spojovány s patogenezí IgAN (např. Gd-IgA1, IgG a IgA anti-Gd IgA1 protilátky, CD89, močový sTfR) (27, 36, 44, 113), nebo se stupněm poškození funkce ledvin u nemocných s IgAN (např. IL-6/EGF, MCP-1/EGF ratio) (60, 61).

Glykoproteiny mají zásadní úlohu v mezibuněčných interakcích a jejich ztráty do moči (např. α -1-mikroglobulin a β -2-mikroglobulin) jsou typické pro poškození tubulárních funkcí (114, 115). Například byla opakovaně popsána úloha apolipoproteinu jako rizikového faktoru progresu IgAN (54, 128). V naší studii byla rovněž potvrzena zvýšená hladina tohoto markeru v moči.

V patogenezi IgAN se uplatňují specifické imunokomplexy tvořené z Gd-IgA1-IgG a Gd-IgA1-IgA1, které se mohou vázat na monocyty nebo makrofágy prostřednictvím CD89 receptoru (28). Takto vytvořený komplex se dále váže na sTfR CD71 v mezangiu ledvin (116). Tato vazba vede k lokální expresi nové molekuly transglutaminázy 2 (43), což následně způsobuje vzestup receptorů CD71 s rostoucí depozicí IgA1.



Obr. 26: Patogeneze IgAN, převzato z: Moresco RN, Speeckaert MM, Delanghe JR., Diagnosis and monitoring of IgA nephropathy: the role of biomarkers as an alternative to renal biopsy. Autoimmun. Rev. 2015; 14(10):847-53.

Recentní práce poukázaly na sTfR receptor jako významný marker progresu IgAN (27, 3). U nemocných s aktivní IgAN nebo Henoch-Schönleinovou purpurou byly potvrzeny zvýšené hladiny sTfR a močové koncentrace sTfR korelovaly se závažností proteinurie (27). V naší studii byly zjištěné zvýšené hodnoty serotransferinu v souladu se závěry jiných prací (111).

Nedávné studie zvažují faktory komplementu jako možné biomarkery IgAN s ohledem na jejich roli v patogenezi onemocnění (12, 13). Imunitní komplexy obsahující glomerulární IgA1

způsobují lokálně aktivaci komplementu (12,13), proliferaci mezangiálních buněk, tvorbu extracelulární matrix a cytokinů (například TNF α , TGF β) (8), které mohou změnit glomerulární permeabilitu a genovou expresi podocytů (117). Mezangio-podocytární poškození může být vysvětlením pro vznik proteinurie a rozvoj tubulo-intersticiálních změn u nemocných s IgAN. Aktivita komplementu je spojována s progresí a aktivitou IgAN (66). V kohortě 162 čínských pacientů byla zkoumána úroveň hladiny močového manan-vázacího lektinu se závažností onemocnění IgAN (66). Byla prokázána souvislost mezi hladinou močového manan-vázacího lektinu se známými klinickými prognostickými faktory IgAN zahrnujícími renální funkci, hypertenzi a proteinurii (66). Hladiny močového manan-vázacího lektinu korelovaly s histopatologickými parametry dle Oxfordské klasifikace (MEST) – hypercelularitou, segmentální glomerulosklerózou, endokapilární hypercelularitou a tubulární atrofii/intersticiální fibrózou (66). Studie potvrdila, že vyšší hladiny močového manan-vázacího lektinu jsou u pacientů s IgAN spojovány se závažnějším postižením ledvin a nepříznivou prognózou onemocnění (66).

Další studie se zabývala významem močového IL-6/EGF jako markeru progresu IgAN (60). U pacientů s pokročilou renální insuficiencí byl potvrzen poměr IL-6/EGF > 1 (60). V naší práci jsme zaznamenali u pacientů s IgAN v době biopsie snížené hladiny pro-epidermálního růstového faktoru ve srovnání se zdravými kontrolami.

Uromodulin je rovněž významným regulačním glykoproteinem, který podléhá regulačním vlivům některých cytokinů, například IL-1 nebo TNF α . U nemocných s IgAN byly prokázány zvýšené hladiny IgA nebo IgA-IgG komplexů (118). Komplex IgA-uromodulin by mohl být důležitým markerem IgAN (74). Zvýšení komplexu IgA-uromodulin bylo pozorováno zejména v časných fázích onemocnění spojených se zánětem (74). V naší kohortě nemocných s IgAN se zachovalou funkcí ledvin byla hladina uromodulinu v moči snížena ve srovnání se zdravými kontrolami.

Předpokládá se, že nemocní s IgAN s vyšší hladinou Gd-IgA1 a/nebo specifických protilátek typu IgG nebo IgA či s vyšší hladinou biomarkerů v moči, kumulací genetických rizik, mají výrazně závažnější prognózu. Tito nemocní vyžadují pečlivější pravidelné sledování klinických parametrů a zvážení agresivnějšího léčebného postupu. U nemocných se závažnou aktivitou onemocnění IgAN podmíněnou histologickým nálezem a klinickými parametry, by mohla být při včasné rozpoznání míry rizika dříve zahájena imunosupresivní léčba s cílem zpomalení progresu funkce ledvin do terminálního selhání.

13.5 Zhodnocení intrarenálního barvení TLR u pacientů s IgAN

Zabývali jsme se hodnocením barvení TLR proteinů ve tkáni ledvin pacientů s IgAN. Recentní práce zkoumaly expresi mRNA TLR v buňkách leukocytů periferní krve u nemocných s IgAN a souvislosti specifických TLR9 polymorfismů s progresí onemocnění v kohortě japonských pacientů (80, 84, 105, 119, 120). Stupeň proteinurie u nemocných s IgAN koreloval s expresí TLR2, 3, 4, 5 a 9 v periferních leukocytech (84). Expresie mRNA TLR4 korelovala s proteinurií i mikroskopickou hematurií (84). V naší práci jsme prokázali výrazně zvýšené barvení TLR4, 7, 8 a 9 ve vzorcích biopsie ledvin u pacientů s IgAN oproti zdravé tkáni ledvin i pacientům s jiným onemocněním ledvin.

Recentní studie zabývající se úlohou střevní flóry u pacientů s CKD prokázaly, že zvýšená střevní propustnost u pacientů s CKD vede k vyšším hladinám cirkulujících liposacharidů s následnou aktivací TLR a rozvojem zánětlivých změn, což pravděpodobně může souviset s progresí chronického onemocnění ledvin (121). Tyto závěry podporují i naše výsledky zvýšeného barvení intrarenálních TLR4 u nemocných s IgAN a progresivní renální insuficiencí. V experimentech in vitro je patrné, že cesta TLR4 může být zapojena do progresu IgAN prostřednictvím uvolnění transkripčních faktorů, zejména Nf-kB a prozánětlivých cytokinů (120). V experimentech na krysích modelech je zřejmé, že antagonist receptoru γ (PPAR- γ)

aktivovaný peroxizonomým proliferátorem (například pyoglitazon) ukázal protizánětlivé účinky s potlačením aktivity a exprese TLR4 (120). V naší studii bylo zjištěno zvýšené barvení intrarenálních TLR4 u pacientů s IgAN a proteinurií >1 g/24hod, stejně jako u pacientů s renální insuficiencí (Tab. 25). Byla pozorována souvislost mezi expresí a progresí IgAN a polymorfismem TLR9 (122). Při genomovém screeningu počtu variant kopií (CNV) rodinných příslušníků pacientů s IgAN, zdravých příbuzných a dalších nesouvisejících zdravých jedinců se ukázalo, že nemocní s IgAN se zhoršením funkce ledvin nesou nízký počet kopií genu pro TLR9, nízký CNV byl spojen se snížením exprese TLR9 (123). V B-buňkách zárodečných center tonzil pacientů s IgAN byla nalezena odlišná exprese ligandu indukujícího proliferaci (APRIL), která byla navozena TLR9 (124). Tato odchylná exprese APRIL korelovala s proteinurií a dobře reagovala na tonzilektomii poklesem sérového Gd-IgA1 u nemocných s IgAN (124). Existuje předpoklad, že u nemocných s IgAN by mohla být osa TLR9-BAFF-IgA, která by mohla vést k zvýšené produkci IgA (125). Zvažuje se, že nadměrná exprese TLR9-mRNA, TLR9 proteinu v leukocytech periferní krve a zvýšená hladina BAFF může vést k vyšší expresi IgA1, může hrát roli ve vývoji onemocnění IgAN (126). Intrarenální barvení TLR7 neprokázalo rozdíly mezi nemocnými s IgAN a zdravými kontrolami. Ve zvířecích modelech byla dáвана souvislost nadměrné exprese TLR8 s poškozením podocytů u glomerulonefritid (127). Domníváme se, že intenzivnější intrarenální barvení TLR8 může signalizovat podobné poškození i u pacientů s IgAN a proteinurií.

14 Přehled publikací

Publikace, které jsou podkladem disertační práce:

1. Maixnerova D, Neprasova M, Skibova J, Mokrisova J, Rysava R, Reiterova J, Jancova E, Merta M, Zadrazil J, Honsova E, Tesar V. IgA nephropathy in Czech patients-are we able reliably predict the outcome?. *Kidney Blood Press. Res.* 2014; 39(6):555-62.
The first two authors contributed equally to the work. **IF 2,0**
2. Neprasova M, Maixnerova D, Novak J, Reily C, Julian BA, Boron J, Novotny P, Suchanek M, Tesar V, Kacer P. Toward Noninvasive Diagnosis of IgA Nephropathy: Pilot Urinary Metabolomic and Proteomic Study. *Dis Markers.* 2016; 2016:3650909. **IF 2,348**
3. Maixnerova D, Ling CH, Hall S, Reily C, Brown R, Neprasova M, Suchanek M, Honsova E, Zima T, Novak J, Tesar V. Galactose-deficient IgA1 and the Corresponding IgG Autoantibodies Predict IgA Nephropathy Progression. **připraveno k publikaci**
4. Prikryl P, Vojtova L, Maixnerova D, Vokurka M, Neprasova M, Zima T, Tesar V. Proteomic approach for identification of IgA nephropathy-related biomarkers in urine. *Physiol Res.* 2017; 66(4):621-632. **IF 1,643**
5. Ciferska H, Honsova E, Lodererova A, Hruskova Z, Neprasova M, Suchanek M, Zima T, Coppo R, Tesar V, Novak J, Maixnerova D. Renal expression of Toll-like receptors 4 and 9 is associated with severity of IgA nephropathy. **připraveno k publikaci**
6. Maixnerova D, Reily C, Bian Q, Neprasova M, Novak J, Tesar V. Markers for the progression of IgA nephropathy. *J Nephrol.* 2016; 29(4):535-41. **IF 2,153**

15 Souhrn

V této práci jsme se zabývali výzkumem neinvazivních diagnostických testů, které by bylo možné použít k diagnostice, zhodnocení aktivity onemocnění či zhodnocení rizika progresu funkce ledvin u českých pacientů s IgAN.

V rozsáhlé kohortě 520 českých pacientů s IgAN s průměrnou dobou sledování 6 let jsme potvrdili nejdůležitější již známé klinické rizikové faktory ovlivňující renální prognózu pacientů s IgAN zahrnující hypertenzi, proteinurii a renální funkci v době diagnózy. Doložení těchto klinických rizikových faktorů zvyšuje důraz na pečlivé sledování těchto parametrů v klinické praxi a intenzivní snahu o jejich optimalizaci s cílem zlepšení renální prognózy nemocných s IgAN.

Zkoumali jsme souvislost Gd-IgA1 a specifických anti-Gd-IgA1 s aktivitou onemocnění a jejich vliv na renální prognózu českých pacientů s IgAN. Potvrdili jsme zvýšenou hladinu Gd-IgA1 za marker progresu onemocnění. Zjistili jsme nový predikční model progresu, kdy již v době diagnózy onemocnění bude možné pomocí jednoho klinického parametru (eGFR) a sérového markeru (anti-Gd-IgA1) předpovědět prognózu pacientů s IgAN. Potvrdili jsme sérovou hladinu specifických anti-Gd-IgA1 měřenou v době biopsie ledvin jako možný marker, pomocí kterého by již v době biopsie ledvin bylo možné odlišit pacienty s mírnou formou onemocnění od nemocných s progresivním typem choroby. Tyto nálezy bude jistě v budoucnosti nutné potvrdit na rozsáhlejších souborech nemocných. Pokud se podaří potvrdit tyto nálezy na rozsáhlejších souborech nemocných, bude možné za použití kombinace těchto markerů (Gd-IgA1, IgA) a parametru renální funkce (eGFR), nebo pomocí markeru IgG-antiGd-IgA1 identifikovat nemocné s progresivním typem onemocnění a zahájit včas adekvátní imunosupresivní léčbu, která by zamezila selhání ledvin.

V dalších dvou studiích jsme se zabývali výzkumem močového proteomu, jehož složení odráží řadu fyziologických i patologických procesů probíhajících v uropoetickém traktu a může se tak

stát zdrojem markerů IgAN. Podařilo se nám identifikovat panel sedmi močových markerů, pomocí kterého je možné odlišit nemocné s IgAN od zdravých kontrol. Potvrdili jsme 30 močových proteinů, jejichž hladina se signifikantně lišila u nemocných s IgAN od hladin u zdravých kontrol. Nepochybně bude nutné potvrdit výsledky na větších kohortách nemocných. Nicméně závěry naší studie poskytují vodítko k získání markerů, které by usnadnily diagnostiku IgAN neinvazivní cestou a umožnily eliminovat nutnost biopsie ledvin spojenou s řadou rizik, zejména ohrožujícím krvácením. Tyto markery pomohou i ke stanovení aktivity onemocnění s optimálním nasazením imunosupresivní terapie s cílem oddálení selhání ledvin. Další výsledky potvrdily intenzivnější intrarenální barvení TLR4, 7, 8 a 9 u pacientů s IgAN proti zdravým kontrolám. Intrarenální barvení TLR rozlišilo i podskupiny IgAN s různou úrovní proteinurie a renální funkce. Intrarenální barvení TLR spolu s klinickými parametry (eGFR, proteinurie), sérovými a močovými biomarkery umožní výrazně lépe zhodnotit prognózu pacientů s IgAN.

16 Summary

In this work we investigated non-invasive diagnostic tests that could be used to diagnose, assess the activity of the disease or evaluate the risk of progression of renal function in Czech patients with IgAN.

In an extensive cohort of 520 Czech IgAN patients with an average follow-up of 6 years we confirmed the most important known clinical risk factors influencing the renal prognosis of IgAN patients including hypertension, proteinuria and renal function at the time of diagnosis. The evidence of these clinical risk factors increases the emphasis on careful monitoring of these parameters in clinical practice and an intensive effort to optimize them in order to improve the renal prognosis of patients with IgAN.

We investigated the association of Gd-IgA1 and specific anti-Gd-IgA1 with disease activity and their effect on renal prognosis of Czech patients with IgAN. We confirmed that the elevated level of Gd-IgA1 is a marker of disease progression. We found a new predictive model of progression, the prognosis of patients with IgAN being predicted by a clinical parameter (eGFR) and a serum marker (anti-Gd-IgA1) at the time of diagnosis. We confirmed the serum level of specific anti-Gd-IgA1 measured at renal biopsy as a potential marker to help distinguish patients with mild disease from patients with progressive disease in time of renal biopsy. These findings will surely need to be confirmed in the future on larger cohorts of patients. If these findings are confirmed in larger patient's populations, patients with the progressive type of disease will be identified using a combination of these markers (Gd-IgA1, IgA) and renal function parameter (eGFR) or IgG-antiGd-IgA1 marker to initiate an adequate early onset of the immunosuppressive treatment to prevent kidney failure.

In the other two studies we investigated the urinary proteome, the composition of which may reflect physiological and pathological processes occurring in the uropoetic tract and can thus become a source of IgAN markers. We were able to identify a panel of seven urinary markers that can distinguish patients with IgAN from healthy controls. We confirmed 30 urinary proteins which levels were significantly different in patients with IgAN from levels in healthy controls. Undoubtedly, these results should be confirmed on larger cohorts of patients. However, the findings of our study provide a guide to obtain markers that would facilitate diagnosis of IgAN in a non-invasive way and allow the elimination of the need for renal biopsy associated with number of risks, particularly threatening bleeding. These markers also help to determine disease activity with the optimal use of immunosuppressive treatment to delay renal failure.

Further results confirmed intensified intrarenal staining of TLR4, 7, 8 and 9 in IgAN patients compared healthy controls. Intrarenal staining of TLR also distinguished IgAN subgroups with different levels of proteinuria and renal function. Intrarenal staining of TRL together with clinical parameters (eGFR, proteinuria), serum and urinary biomarkers significantly improve the evaluation of the prognosis of patients with IgAN.

17 Literatura

1. Novak J, Rizk D, Takahashi K et al., New Insights into the pathogenesis of IgA Nephropathy. *Kidney Dis. (Basel)*. 2015; 1(1):8-18.
2. Berthoux F, Mohey H, Laurent B et al., Predicting the risk for dialysis or death in IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2011; 22:752–61.
3. Maixnerova D, Reily C, Brian Q et al., Markers for the progression of IgA nephropathy. *J. Nephrol.* 2016; 29(4):535-41.
4. Kiryluk K, Li Y, Sanna-Cherchi S et al., Geographic differences in genetic susceptibility to IgA nephropathy: GWAS replication study and geospatial risk analysis. *PLoS Genet.* 2012; 8:e1002765.
5. Kiryluk K, Li Y, Scolari F et al., Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. *Nat. Genet.* 2014; 46:1187-1196.
6. Tomana M, Matousovic K, Julian BA et al., Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney Int.* 1997; 52:509-516.
7. Tomana M, Novak J, Julian BA et al., Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *J. Clin. Invest.* 1999; 104:73-81.
8. Novak J, Raskova Kafkova L et al., IgA1 immune complexes from pediatric patients with IgA nephropathy activate cultured human mesangial cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2011; 26:3451-3457.
9. Barbour SJ, Cattran DC, Espino-Hernandez G et al., Identifying the ideal metric of proteinuria as a predictor of renal outcome in idiopathic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2015; 88:1392–1401.

12. Maillard N, Wyatt RJ, Julian BA et al., Current understanding of the role of complement in IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2015; 26:1503-1512.
13. Schmitt R, Stahl AL, Olin AI et al., The combined role of galactose-deficient IgA1 and streptococcal IgA-binding M protein in inducing IL-6 and C3 secretion from human mesangial cells: implications for IgA nephropathy. *J. Immunol.* 2014; 193:317-326.
14. Lai KN, Leung JC, Chan LY et al., Activation of podocytes by mesangial-derived TNF- α : glomerulo-podocytic communication in IgA nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2008; 294:F945-955.
15. Tesař V, Viklický O., *Klinická nefrologie*, 2. zcela přepracované a doplněné vydání, Grada publishing a.s., 2015; 118.
16. Moriyama T, Tanaka K, Iwasaki C et al., Prognosis in IgA nephropathy: 30-year analysis of 1,012 patients at a single center in Japan. *PLoS One.* 2014; 9: e91756.
17. Bellur SS, Troyanov S, Cook HT et al., Working Group of International IgA Nephropathy Network and Renal Pathology Society. Immunostaining findings in IgA nephropathy: correlation with histology and clinical outcome in the Oxford classification patient cohorts. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2011; 26:2533–2536.
18. Wada Y, Ogata H, Takeshige Y et al., Clinical significance of IgG deposition in the glomerular mesangial area in patients with IgA nephropathy. *Clin. Exp. Nephrol.* 2013; 17:73–82.
19. Alamartine E, Sauron C, Laurent B et al., The use of Oxford classification of IgA nephropathy to predict renal survival. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2011; 6:2384–2388.
20. Barbour SJ, Reich HN., Risk stratification of patients with IgA nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* 2012; 59:865–73.

21. Coppo R, D'Amico G., Factors predicting progression of IgA nephropathies. *J. Nephrol.* 2005; 18:503–512.
22. Roberts IS, Cook HT, Troyanov S et al., The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney Int.* 2009; 76:546–556.
23. Barbour SJ, Espino-Hernandez G, Reich HN et al., Oxford Derivation, North American Validation and VALIGA Consortia, The MEST score provides earlier risk prediction in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2016; 89(1):167-75.
24. Coppo R, Troyanov S, Bellur S et al., Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy in cohorts with different presentations and treatments. *Kidney Int.* 2014; 86:828–836.
25. Yanagawa H, Suzuki H, Suzuki Y et al., A panel of serum biomarkers differentiates IgA nephropathy from other renal diseases. *PLoS One.* 2014; 9(5):e98081.
26. Zhao N, Hou P, Lv J et al., The level of galactose-deficient IgA1 in the sera of patients with IgA nephropathy is associated with disease progression. *Kidney Int.* 2012; 2(7):790-6.
27. Delanghe SE, Speeckaert MM, Segers H et al., Soluble transferrin receptor in urine, a new biomarker for IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Clin. Biochem.* 2013; 46(7-8):591-7.
28. Launay P, Grossetête B, Arcos-Fajardo M et al., Fcα receptor (CD89) mediates the development of immunoglobulin A (IgA) nephropathy (Berger's disease). Evidence for pathogenic soluble receptor-IgA complexes in patients and CD89 transgenic mice. *J. Exp. Med.* 2000; 191(11):1999-2009.
29. Lechner SM, Papista C, Chemouny JM et al., Role of IgA receptors in the pathogenesis of IgA nephropathy. *J. Nephrol.* 2016; 29(1):5-11.

30. Peters HP, Waanders F, Meijer E et al., High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of end-stage renal disease in patients with IgA nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2011; 26:3581–3588.
31. Peters HP, van den Brand JA, Wetzels JF et al., Urinary excretion of low-molecular-weight proteins as prognostic markers in IgA nephropathy. *Neth. J. Med.* 2009; 67:54–61.
32. Wu J, Wang N, Wang J et al., Identification of a uromodulin fragment for diagnosis of IgA nephropathy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010; 24(14):1971-8.
33. Tomana M, Niedermeier W, Spivey C et al., Microdetermination of monosaccharides in glycoproteins by gas-liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 1978; 89(1):110-8.
34. Moldoveanu Z, Wyatt RJ, Lee JY et al., Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels. *Kidney Int.* 2007; 71(11):1148-54.
35. Hastings MC, Moldoveanu Z, Julian BA et al., Galactose-deficient IgA1 in African Americans with IgA nephropathy: serum levels and heritability. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 5(11):2069-74.
36. Suzuki H, Fan R, Zhang Z et al., Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *J. Clin. Invest.* 2009; 119:1668–1677.
37. Berthoux F, Suzuki H, Thibaudin L et al., Autoantibodies targeting galactose-deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2012; 23:1579–1687.
38. Hastings MC, Moldoveanu Z, Suzuki H et al., Biomarkers in IgA nephropathy: relationship to pathogenetic hits. *Expert. Opin. Med. Diagn.* 2013; 7(6):615-27.

39. Dickinson SJ, Mendichovzsky I, Molyneux K et al., O-galactosylation patterns of serum IgA1 in patients with IgA nephropathy remain constant over long periods of time. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 19:659A.
40. Hastings MC, Sanders JT, Moldoveanu Z et al., Serial measurement of galactose-deficient IgA1 (Gd-IgA1) in children. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 21:635A.
41. Czerkinsky C, Koopman WJ, Jackson S et al., Circulating immune complexes and immunoglobulin A rheumatoid factor in patients with mesangial immunoglobulin A nephropathies. *J. Clin. Invest.* 1986; 77(6):1931-8.
42. Schena FP, Pastore A, Ludovico N et al., Increased serum levels of IgA1-IgG immune complexes and anti-F(ab')₂ antibodies in patients with primary IgA nephropathy. *Clin. Exp. Immunol.* 1989; 77(1):15-20.
43. Berthelot L, Papista C, Maciel TT et al., Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *J. Exp. Med.* 2012; 209(4):793-806.
44. Vuong MT, Hahn-Zoric M, Lundberg S et al., Association of soluble CD89 levels with disease progression but not susceptibility in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2010; 78(12):1281-7.
45. Wyatt RJ, Forristal J, Davis CA et al., Control of serum C3 levels by beta 1H and C3b inactivator. *J. Lab. Clin. Med.* 1980; 95(6):905-17.
46. Julian BA, Wyatt RJ, McMorro RG et al., Serum complement proteins in IgA nephropathy. *Clin. Nephrol.* 1983; 20(5):251-8.
47. Tomino Y, Suzuki S, Imai H et al., Measurement of serum IgA and C3 may predict the diagnosis of patients with IgA nephropathy prior to renal biopsy. *J. Clin. Lab. Anal.* 2000; 14(5):220-3

48. Nakayama K, Ohsawa I, Maeda-Ohtani A et al., Prediction of diagnosis of immunoglobulin A nephropathy prior to renal biopsy and correlation with urinary sediment findings and prognostic grading. *Clin. Lab. Anal.* 2008; 22(2):114-8.
49. Wyatt RJ, Kanayama Y, Julian BA et al., Complement activation in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 1987; 31(4):1019-23.
50. Wyatt RJ, Julian BA. Activation of complement in IgA nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* 1988; 12(5):437-42.
51. Julian BA, Wittke S, Haubitz M et al., Urinary biomarkers of IgA nephropathy and other IgA-associated renal diseases. *World J. Urol.* 2007; 25(5):467-76.
52. Haubitz M, Wittke S, Weissinger EM et al., Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2005; 67:2313–2320.
53. Marek-Bukowiec K, Konieczny A, Ratajczyk K et al., Candidate Urine Peptide Biomarkers for IgA Nephropathy: Where Are We Now?. *Dis Markers.* 2018; 2018:5205831.
54. Julian BA, Wittke S, Novak J et al., Electrophoretic methods for analysis of urinary polypeptides in IgA-associated renal diseases. *Electrophoresis.* 2007; 28(23):4469-83.
55. Candiano G, Musante L, Bruschi M et al., Repetitive fragmentation products of albumin and alpha1-antitrypsin in glomerular diseases associated with nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17(11):3139-48.
56. Prikryl P¹, Vojtova L, Maixnerova D et al., Proteomics approach for identification of IgA nephropathy-related biomarkers in urine. *Physiol. Res.* 2017; 66(4):621-632.
57. Delanghe SE, Speeckaert MM, Segers H et al., Soluble transferrin receptor in urine, a new biomarker for IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Clin. Biochem.* 2013; 46(7-8):591-7.

58. Peters HP, van den Brand JA, Wetzels JF et al., Urinary excretion of low-molecular-weight proteins as prognostic markers in IgA nephropathy. *Neth. J. Med.* 2009; 67:54–61.
59. Peters HP, Waanders F, Meijer E et al., High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of end-stage renal disease in patients with IgA nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2011; 26:3581–3588.
60. Ranieri E, Gesualdo L, Petrarulo F et al., Urinary IL-6/EGF ratio: a useful prognostic marker for the progression of renal damage in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 1996; 50(6):1990-2001.
61. Torres DD, Rossini M, Manno C et al., The ratio of epidermal growth factor to monocyte chemotactic peptide-1 in the urine predicts renal prognosis in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2008; 73(3):327-33.
62. Aizawa T, Imaizumi T, Tsuruga K et al., Urinary fractalkine and monocyte chemoattractant protein-1 as possible predictors of disease activity of childhood glomerulonephritis. *Tohoku J. Exp. Med.* 2013; 231(4):265-70.
63. Rocchetti MT, Papale M, d'Apollo AM et al., Association of urinary laminin G-like 3 and free K light chains with disease activity and histological injury in IgA nephropathy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2013; 8(7):1115-25.
64. Candiano G, Musante L, Bruschi M et al., Repetitive fragmentation products of albumin and alpha1-antitrypsin in glomerular diseases associated with nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17(11):3139-48.
65. Asao R, Asanuma K, Kodama F et al., Relationships between levels of urinary podocalyxin, number of urinary podocytes, and histologic injury in adult patients with IgA nephropathy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2012; 7(9):1385-93.

66. Liu LL, Jiang Y, Wang LN et al., Urinary mannose-binding lectin is a biomarker for predicting the progression of immunoglobulin (Ig)A nephropathy. *Clin. Exp. Immunol.* 2012; 169(2):148-55.
67. Sogabe A, Uto H, Kanmura S et al., Correlation of serum levels of complement C4a desArg with pathologically estimated severity of glomerular lesions and mesangial hypercellularity scores in patients with IgA nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 2013; 32(2):307-14.
68. Xu PC, Zhang JJ, Chen M et al., Urinary kidney injury molecule-1 in patients with IgA nephropathy is closely associated with disease severity. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2011; 26(10):3229-36.
69. Kalliakmani P, Nakopoulou L, Tsakas S et al., Effect of treatment on urinary kidney injury molecule-1 in IgA nephropathy. *BMC Nephrol.* 2013; 14:139.
70. Aizawa T, Imaizumi T, Tsuruga K et al., Urinary fractalkine and monocyte chemoattractant protein-1 as possible predictors of disease activity of childhood glomerulonephritis. *Tohoku J. Exp. Med.* 2013; 231(4):265-70.
71. Kalliakmani P, Nakopoulou L, Tsakas S et al., Urinary interleukin-6 (IL-6) and transforming growth factor (TGF- β) levels in corticosteroid-treated patients with IgA nephropathy. *Clin. Nephrol.* 2011; 76(2):144-5070
72. Wu J, Wang N, Wang J et al., Identification of a uromodulin fragment for diagnosis of IgA nephropathy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010; 24(14):1971-8.
73. Zhou J¹, Chen Y, Liu Y et al., Urinary uromodulin excretion predicts progression of chronic kidney disease resulting from IgA nephropathy. *PLoS One.* 2013; 8(8): e71023.

74. Obara T, Mizoguchi S, Shimozuru Y et al., The complex of immunoglobulin A and uromodulin as a diagnostic marker for immunoglobulin A nephropathy. *Clin. Exp. Nephrol.* 2012; 16(5):713-21.
75. Suzuki H, Allegri L, Suzuki Y et al., Galactose-Deficient IgA1 as a Candidate Urinary Polypeptide Marker of IgA Nephropathy?. *Dis Markers.* 2016; 2016:7806438.
76. Kumar H, Takeda K, Akira S et al., Encyclopedia of biological chemistry, four-volume set, 1-4. [s.l.]: [s.n.] Kapitola Toll-Like Receptors.
77. Takeda K, Kaisho T, Akira S., Toll-like receptors. *Annu Rev. Immunol.* 2003; 21:335–76.
78. Tipping PG., Toll-like receptors: the interface between innate and adaptive immunity. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17:1769–71.
79. Takeda K, Akira S., Toll-like receptors. *Curr. Protoc. Immunol.* 2015; 109,14.12.1-14.12.10.
80. Saito A¹, Komatsuda A, Kaga H et al., Different Expression Patterns of Toll-Like Receptor mRNAs in Blood Mononuclear Cells of IgANephropathy and IgA Vasculitis with Nephritis. *Tohoku J. Exp. Med.* 2016; 240(3):199-208.
81. Ciferska H, Honsova E, Lodererova A et al., Renal expression of Toll-like receptors 4 and 9 is associated with severity of IgA nephropathy.
82. O'Neill LA., The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol. Rev.* 2008; 226:10–18.
83. Anders HJ, Schlöndorff D., Toll-like receptors: emerging concepts in kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2007; 16:177–83.

84. Coppo R, Camilla R, Amore A et al., Toll Like receptor 4 expression is increased in circulating mononuclear cells of patients with immunoglobulin A nephropathy. Clin. Exp. Immunol. 2010; 159(1):73-81.
85. Vandeginste B M G, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part B, 1998.
86. Anděl, J.: Matematická statistika, SNTL 1985.
87. Bartosik LP, Lajoie G, Sugar L et al., Predicting progression in IgA nephropathy. American Journal of Kidney Diseases 2001; 38(4):728-735
88. Wikipedie, Shluková analýza, editace 15.5.2018, https://cs.wikipedia.org/wiki/Shlukov%C3%A1_anal%C3%BDza
89. Novak J, Renfrow MB, Gharavi AG et al., Pathogenesis of IgA nephropathy. Invited review. Current Opinion in Nephrology and Hypertension 2013; 287–294.
90. Obara T, Mizoguchi S, Shimozuru Z et al., The complex of immunoglobulin A and uromodulin as a diagnostic marker for immunoglobulin A nephropathy. Clinical and Experimental Nephrology 2012; 713–721.
91. Matousovic K, Novak J, Yanagihara T et al., IgA-containing immune complexes in the urine of IgA nephropathy patients. Nephrology Dialysis Transplantation 2006; 21(9):2478–2484.
92. Wu J, Wang N, Wang J et al., Identification of a uromodulin fragment for diagnosis of IgA nephropathy. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2010; 24(14):1971–1978.

93. Reich HN, Troyanov S, Scholey JW et al., Toronto Glomerulonephritis Registry. Remission of proteinuria improves prognosis in IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 18:3177-3183.
94. Geddes CC, Rauta V, Gronhagen-Riska C et al., A tricontinental view of IgA nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003; 18:1541-1548.
95. Maixnerova D, Bauerova L, Tesar V et al., The retrospective analysis of 343 Czech patients with IgA nephropathy – one centre experience. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2011; 0:1-7.
96. Lee H, Kim DK, Oh KH et al., Mortality of IgA nephropathy patients: a single center experience over 30 years. *PLOS One* 2012; 7:e51225.
97. Katafuchi R, Ninomiya T, Nagata M et al., Validation study of Oxford classification of IgA nephropathy: The significance of extracapillary proliferation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol* 2011; 6:2806-2813.
98. Koyama A, Igarashi M, Kobayashi M et al., Coworkers of the research group on progressive renal disease. Natural history and risk factors for immunoglobulin A nephropathy in Japan. *Am. J. Kidney Dis.* 1997; 29:526–532.
99. Maixnerova D, Jancova E, Tesar V et al., Nationwide biopsy survey of renal diseases in the Czech Republic during the years 1994-2011. *J. Nephrol.* 2015; 28(1):39-49.
100. Le W, Liang S, Hu Y et al., Long-term renal survival and related risk factors in patients with IgA nephropathy: results from a cohort of 1155 cases in a Chinese adult population. *Nephrol. Dial. Transplant* 2012; 27:1479–1485.
101. Miura N, Imai H, Kikuchi S et al., Tonsillectomy and steroid pulse (TSP) therapy for patients with IgA nephropathy: a nationwide survey of TSP therapy in Japan and an analysis of the predictive factors or resistance to TSP therapy. *Clin. Exp. Nephrol.* 2009; 13:460-466.

102. Moriyama T, Suzuki K, Sugiura H et al., Frequency of renal disease in Japan: An analysis of 2.404 renal biopsies at a single center. *Nephron. Clin. Pract.* 2010; 115:227-236.
103. Komatsu H, Fujimoto S, Hara S et al., Recent therapeutic strategies improve renal outcome in patients with IgA nephropathy. *Am. J. Nephrol.* 2009; 30:19-25.
104. Radford MG Jr, Donadio JV Jr, Bergstralh EJ et al., Predicting renal outcome in IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1997; 8:199-207.
105. Nakata J, Suzuki Y, Suzuki H et al., Changes in nephritogenic serum galactose-deficient IgA1 in IgA nephropathy following tonsillectomy and steroid therapy. *PLoS ONE* 2014; 9(2):e89707.
106. Coppo R, Camilla R, Amore A et al., Oxidative stress in IgA nephropathy. *Nephron. Clin. Pract.* 2010; 116(3):c196-8.
107. Camilla R, Suzuki H, Dapra V et al., Oxidative stress and galactose-deficient IgA1 as markers of progression in IgA nephropathy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2011; 6(8):1903-11.
108. Zaferani A, Viv`es RR, Van Der Pol P et al., Identification of tubular heparan sulfate as a docking platform for the alternative complement component properdin in proteinuric renal disease. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(7):5359-67.
109. Celie JW, Reijmers RM, Slot EM et al., Tubulointerstitial heparan sulfate proteoglycan changes in human renal diseases correlate with leukocyte influx and proteinuria. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2008; 294(1):F253-63.
110. Yanhong L, Jian W, Xueming Z et al., Urinary protein markers predict the severity of renal histological lesions in children with mesangial proliferative glomerulonephritis. *BMC Nephrol.* 2012; 13: 29.
111. Moon PG, Lee JE, You S et al., Proteomic analysis of urinary exosomes from patients of early IgA nephropathy and thin basement membrane nephropathy. *Proteomics* 2011; 11(12):2459-75.

112. Stangou M, Alexopoulos E, Papagianni A et al., Urinary levels of epidermal growth factor, interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 may act as predictor markers of renal function outcome in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology* 2009; 14(6):613-20.
113. Boyd JK, Barrat J., Immune complex formation in IgA nephropathy: CD89 a 'saint' or a 'sinner'? *Kidney Int.* 2010; 78(12):1211-3.
114. Woo KT, Lau YK, Lee GSL et al., Pattern of proteinuria in IgA nephropathy. *Nephrol.* 1997; 3:31-34.
115. Woo KT, Tan YO, Yap HK et al., Beta-2-microglobulin in mesangial IgA nephropathy. *Nephron.* 1981; 37:78-81.
116. Moura IC, Arcos-Fajardo M, Sadaka C et al., Glycosylation and size of IgA1 are essential for interaction with mesangial transferrin receptor in IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004; 15(3): 622-34.
117. Lai KN, Leung JC, Chan LY et al., Podocyte injury induced by mesangial-derived cytokines in IgA nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant* 2009; 24:62–72.
118. Matousovici K, Novak J, Yanagihara T et al., IgA-containing immune complexes in the urine of IgA nephropathy patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006; 21:2478-84.
119. Donadio ME, Loiacono E, Peruzzi L et al., Toll-like receptors, immunoproteasome and regulatory T cells in children with Henoch-Schönlein purpura and primary IgA nephropathy. *Pediatr. Nephrol.* 2014; 29(9):1545-1551.
120. Zou JN, Xiao J, Hu SS et al., Toll-like receptor 4 signaling pathway in the protective effect of pioglitazone on experimental immunoglobulin A nephropathy. *Chin. Med. J.* 2017; 130(8):906-913.
121. Anders HJ, Andersen K, Stecher B., The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney Int.* 2013; 83(6):1010-1006.

122. Suzuki H, Suzuki Y, Narita I et al., Toll-like receptor 9 affects severity of IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 19(12):2384-2395.
123. Sallustio F, Cox SN, Serino G et al., Genome-wide scan identifies a copy number variable region at 3p21.1 that influences the TLR9 expression levels in IgA nephropathy patients. *Eur. J. Hum. Genet.* 2015; 23(7):940-948.
124. Muto M, Manfroi B, Suzuki H et al., Toll-like receptor 9 stimulation induces aberrant expression of a proliferation-inducing ligand by tonsillar germinal center B cells in IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2017; 28(4):1227-1238.
125. Li W, Peng X, Liu Y et al., TLR9 and BAFF: their expression in patients with IgA nephropathy. *Mol. Med. Rep.* 2014; 10(3):1469-1474.
126. Imaizumi T, Aizawa T, Segawa C et al., Toll-like receptor 3 signaling contributes to the expression of a neutrophil chemoattractant, CXCL1 in human mesangial cells. *Clin. Exp. Nephrol.* 2015; 19(5):761-770.
127. Kimura J, Ichii O, Miyazono K et al., Overexpression of Toll-like receptor 8 correlates with the progression of podocyte injury in murine autoimmune glomerulonephritis. *Sci. Rep.* 2014; 4:7290.
128. Florquin S, Nunziata R, Claessen N et al., CD44 expression in IgA nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* 2002; 39(2):407-14.
129. McMahon B, Mitchell D, Shattock R et al., Lipoxin, leukotriene, and PDGF receptors cross-talk to regulate mesangial cell proliferation. *The FASEB Journal.* 2002; 16(13):1817–1819.

18 Příložené publikace